

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

THAIS LAZARINO MACIEL

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Myrsine umbellata*
(PRIMULACEAE) EM REMANESCENTES DA FLORESTA ATLÂNTICA**

ALEGRE-ES

2015

THAIS LAZARINO MACIEL

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Myrsine umbellata*
(PRIMULACEAE) EM REMANESCENTES DA FLORESTA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Orientadora: Professora Doutora Milene Miranda
Praça Fontes.

ALEGRE-ES

2015

THAIS LAZARINO MACIEL DA COSTA

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Myrsine umbellata*
(PRIMULACEAE) EM REMANESCENTES DA FLORESTA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Aprovada:29/07/2015.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Milene Miranda Praça Fontes
Universidade Federal do Espírito Santo
(orientadora)

Marcia Flores da Silva Ferreira
Universidade Federal do Espírito Santo
(coorientadora)

Prof^a. Dr^a Tatiana Tavares Carrijo
Universidade Federal do Espírito Santo
(coorientadora)

Prof^o Dr^o Fábio Miranda Demolinari
Universidade Federal do Espírito Santo

Dr^a Carla Cristina Gonçalves Rosado
Universidade Federal do Espírito Santo

Dedico esse trabalho a minha família e ao meu esposo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a Deus. Pela vida, por mais essa oportunidade e por tantas bênçãos. Obrigada por sua fidelidade mesmo sem eu merecer, só tenho a agradecer Senhor!

Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo pela formação.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento e também a Secretária Sabrina, por todo apoio e ajuda nos momentos delicados da burocracia.

A FAPES e CNPq pelo financiamento do trabalho e a CAPES pela concessão de bolsa;

Sou imensamente grata a minha orientadora Milene Miranda Praça Fontes, por toda sua bondade, paciência, compreensão. Muito obrigada por resolver sempre tantas problemas que eu te trouxe, pela oportunidade de trabalho e também, pela relação extra acadêmica, foi uma parceria maravilhosa. Você é uma mãezona mesmo!!!!

Agradeço muito a minha coorientadora Marcia Flores, por me permitir aprender algo lindo e encantador: a biologia molecular. Obrigada querida professora, por responder meus e-mails na madrugada, mesmo tão ocupada... com tantos orientados, muito obrigada pela adoção. Foi um imenso prazer trabalharmos juntas.

Agradeço a professora Tatiana Carrijo, minha outra coorientadora, por ter “surgido” na minha vida acadêmica. Agradeço por me acompanhar desde a coleta até o entendimento de tudo que fizemos e também por fazer parte da banca. Professora, sem muitas palavras, você é demais. Sem você esse trabalho não existiria!

Agradeço ao Professor Fábio Demolinari por aceitar prontamente participar da banca. Agradeço também, por todo ensinamento e ajudas desde a graduação, pelo exemplo de professor e pessoa que é, contribuindo pra minha formação tanto profissional quanto pessoal!

Agradeço a Carla, uma querida que tive o privilégio de conhecer, por aceitar ser da banca e também por tooooooda a ajuda com o trabalho, mesmo sem imaginar que estaria na defesa.

Agradeço ao professor Adésio, pela ajuda com a estatística do trabalho. Agradeço também pelos puxões de orelha e por tantos conselhos nesses dois anos de mestrado. Só me fez crescer!

Não posso deixar de agradecer ao Professore Wellington por toda formação, todo conhecimento adquirido e por tantas coisas boas que já me proporcionou desde a graduação. Agradeço também, a todos os professores que tive no mestrado. Vocês foram fundamentais pra que eu chegasse até aqui.

Agradeço aos meus maravilhosos pais, minha irmã, meu amado esposo e toda minha família pelas orações, por tanta ajuda, compreensão e apoio. Sei que não sou fácil, principalmente quando estou ansiosa. Eu amo vocês! Essa vitória é nossa.

Agradeço a toda galera do Laboratório de Genética e Melhoramento da UFES, por compartilharem comigo tantos momentos de desespero, de raiva, e principalmente de alegrias, zoações e muita amizade. Obrigado por me acolherem tão bem. Agradeço também ao Zé Henrique, Tiago e Marininha por toda ajuda na estatística. A Jheniffer e Lucas por tornarem os momentos de campo super agradáveis. Agradeço em especial as queridas Liziane e Iana por me ensinarem tudoooooo no laboratório. Entrei sem saber fazer uma PCR saio sabendo tudo!

Agradeço também ao Laboratório de Citogenética Vegetal e Cultura de Tecidos da UFES, onde tudo começou. Aos amigos que fiz lá, meu muito obrigada.

Agradeço as minhas bests amigas da UFES, amigas de lab, de saídas, amigas de tudo: Paula Mikaely, Paula Mauri, Jessica, Carol e também a minha amiga Mayara. Amo vocês!

Agradeço a todos os amigos que fiz no mestrado, amigos da UFES, de Cachoeiro e a todos torceram, me apoiaram, oraram por mim ou de alguma forma contribuíram para que eu atingisse mais esse degrau. Minha mais sincera gratidão!!

RESUMO

MACIEL, T. L. **Diversidade genética em populações de *Myrsine umbellata* (Primulaceae) em remanescentes da Floresta Atlântica.** 2015. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2015.

Parâmetros populacionais inferidos a partir de dados genéticos são úteis na caracterização de populações naturais e importantes na determinação de áreas prioritárias para conservação, a exemplo da Floresta Atlântica, que possui uma extensa biodiversidade, inviabilizando a avaliação completa de suas espécies. Assim, estudos genéticos de algumas populações permitem interpretar a comunidade e extrapolar os resultados para outras espécies similares. *Myrsine umbellata*, é uma espécie arbustiva, amplamente distribuída na Floresta Atlântica, pioneira, facilitadora em áreas de regeneração natural, com dispersão zoocórica, sendo seus frutos importantes na dieta da avifauna. Com o objetivo de identificar a diversidade genética entre e dentro das populações, foram amostradas seis populações de *M. umbellata*, sendo elas: Macieira, Ibitirama, Iúna, Parque Estadual do Forno Grande, Santa Teresa e Parque Estadual da Pedra Azul, totalizando 63 indivíduos. Foram utilizados 10 marcadores moleculares ISSR para amplificações de 129 locos, obtendo 100% de polimorfismo para nove *primers*. Os dados foram submetidos à análise de similaridades entre indivíduos pelo coeficiente de Jaccard, evidenciando maior similaridade entre as populações de Ibitirama e Iúna. O índice de diversidade de Nei (H_e) e o índice de Shannon (H') nas populações variaram de 0,28 a 0,18 e 0,18 a 0,12, respectivamente, sendo a população da Macieira a que apresentou os maiores valores e a população de Ibitirama os menores valores. A AMOVA mostrou que a maior parte da diversidade genética ocorre dentro das populações (67,41%) do que entre (32,58%), com a estatística Φ_{ST} apresentando um alto nível de diferenciação genética em 0,32. O fluxo gênico estimado para o conjunto de populações foi alto ($Nm = 1,24$), mas acredita-se que esse valor esteja atribuído a um fluxo gênico histórico de quando as populações faziam parte de metapopulações, antes dos processos de fragmentação florestal. Foi feita também uma AMOVA para analisar par a par os valores de Φ_{ST} das populações e os valores encontrados indicam que as populações estão de moderada a altamente estruturadas. Foi utilizado o método de agrupamento UPGMA tanto para indivíduos quanto para populações, e dois grandes grupos foram formados, confirmado pela avaliação feita pelo programa STRUCTURE que obteve melhor K igual a 2. A manutenção da variabilidade genética em populações é a base da conservação das espécies, dessa forma, os dados encontrados indicam que estratégias de conservação para populações de *M. umbellata* devem priorizar amostras populacionais que sejam internas, dado que estas são uma importante fonte de germoplasma para a conservação *in situ*.

Palavras Chave: capororoca, fluxo gênico, ISSR.

ABSTRACT

MACIEL, T. L. **Genetic diversity in *Myrsine umbellata* (Primulaceae) populations in Atlantic Forest remnants**. 2015. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2015.

Population parameters inferred from genetic data are useful in the characterization of natural populations and important in determining priority areas for conservation, such as the Atlantic Forest, which has an extensive biodiversity, what makes the complete evaluation of the species not viable. Thus, genetic studies of some populations allow to interpret the community and to extrapolate the results to other similar species. *Myrsine umbellata* is a shrubby species, widely distributed in the Atlantic Forest, a pioneer, a facilitator in natural regeneration areas, with zoochorous dispersion and their fruits are important in the birds diet. In order to identify the genetic diversity between and within the populations, six populations of *M. umbellata* were sampled, which are: Macieira, Ibitirama, Iúna, State Park of Forno Grande, Santa Teresa and State Park of Blue Stone, totaling 63 individuals. 10 ISSR molecular markers were used to amplify 129 *loci*, obtaining 100% of polymorphism for nine primers. The data were submitted to similarities analysis between individuals by Jaccard coefficient, showing greater similarity between the Ibitirama and Iúna populations. The expected Nei diversity index (H_e) and the Shannon index (H') in the populations ranged from 0.28 to 0.18 and 0.18 to 0.12, respectively, where the Macieira population showed the highest values and the Ibitirama population the lowest ones. The AMOVA showed that the most part of the genetic diversity occurs within populations (67.41%) than between populations (32.58%), with the statistical Φ_{ST} presenting a high level of genetic differentiation of 0.32. The allelic flow estimated for the populations set was high ($N_m = 1.24$), but it is believed that this value is assigned to a historical gene flow when populations were part of metapopulations, before the forest fragmentation processes. An AMOVA was also accomplished to examine pairwise the ϕ_{ST} values of the populations, and the values found indicate that the populations are moderate to highly structured. The UPGMA clustering method was used for both, individuals and populations, and two big groups were formed, confirmed by evaluation done by the program STRUCTURE best K, equal to 2 was obtained. The maintenance of genetic variability in populations is the basis of species conservation, therefore, these data indicate that conservation strategies for *M. umbellata* populations should prioritize population samples that are internal, as these are an important source of germplasm for *in situ* conservation.

Keywords: capororoca, gene flow, ISSR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Aspecto geral de *M. umbellata* coletada na população de Santa Teresa, evidenciando o ramo.26
- Figura 2- Mapa de localização dos pontos de coletas. Os Municípios de Dorés do Rio Preto (Macieira) e Ibitirama pertencem ao Parque Nacional do Caparaó; Iúna, Castelo (PE do Forno Grande) a região sul, Domingos Martins (PE Pedra Azul) a região sudoeste-serrana e Santa Teresa a central-serrana.27
- Figura 3- Fotografia do gel de agarose, mostrando o perfil dos fragmentos produzidos pelo primer 834 em indivíduos (39 a 63) de *M. umbellata* das populações de Santa Teresa e PE Pedra Azul. Marcador: 1Kb.....34
- Figura 4- . Dendograma representativo da dissimilaridade genética obtidas com base em marcadores ISSR, utilizando o índice de Jaccard, baseada no método UPGMA para as 6 populações de *M.umbellata*.....39
- Figura 5- Representação tridimensional da distribuição das populações em plano cartesiano. População 1- Macieira, População 2- Ibitirama, População 3- Iúna, População4- PE Forno Grande, População 5- Santa Teresa e População 6- PE Pedra Azul.....40
- Figura 6- Dendograma de dissimilaridade genética, obtido com base em marcadores ISSR, independente das populações, utilizando o método de agrupamento UPGMA para 63 indivíduos de *M. umbellata*.43
- Figura 7- Gráficos obtidos pela análise no STRUCTURE, cada grupo é representado por uma cor, cada indivíduo por uma barra vertical. (A) Gráficos obtidos com K=2 (B) Gráficos obtidos com K=6. (C) Detalhe de cada indivíduo assumindo K=2 (D) Melhor valor obtido para delta K.....44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estudos genético-populacionais realizados para espécies da Floresta Atlântica, utilizando diferentes marcadores.....	20
Tabela 2- Coordenadas geográficas, altitude e número de indivíduos de cada população amostrada.....	28
Tabela 3- Análise descritiva dos primers com respectivas sequências, número total de bandas, número de bandas polimórficas e porcentagem de polimorfismo..	33
Tabela 4- Polimorfismo populacional por ISSR.....	35
Tabela 5- Matriz genética de dissimilaridade entre populações, por meio do índice de dissimilaridade de Jaccard.....	36
Tabela 6- Análise de variância molecular (AMOVA) para as seis populações de <i>M. umbellata</i> . GL = graus de liberdade, SQ = soma do quadrado dos desvios, % =porcentagem de variação e Pv= Valor de P.....	37
Tabela 7- Estimativas de Variância entre os pares de população e estatística ØST.	41

LISTA DE SIGLAS

ISSR	- <i>Inter Simple Sequence Repeats</i>
SSR	- <i>Simple Sequence Repeats</i>
RAPD	- <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
DNA	- <i>Deoxyribonucleic acid</i>
PCR	- <i>polymerase chain reaction</i>
CTAB	- Brometo de cetil- trimetil amônio
AFLP	- <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
EDTA	- Ácido Etileno diamino tetra acetico
K	- Número mais provável de cluster
Nm	- Estimativa de Fluxo gênico
3D	- Terceira dimensão
H'	- Índice de Shannon- Wiener
He	- Índice de Nei- heterozigosidade
PARNA	- Parque Nacional
PE	- Parque Estadual
ØST	- Índice de fixação
Fst	- Divergência genética entre populações
AMOVA	- Análises de variância molecular
UPGMA	- <i>Unweighted Pair Group Method</i> with Arithmetic Mean
MCMC	- <i>Monte Carlo Markov Chain</i>

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	11
--------------	----

1.INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO.....	15
2.2 ESTUDOS DE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NA FLORESTA ATLÂNTICA....	16
2.2.1 Diversidade e estrutura genética nas populações.....	17
2.2.2 A utilização de marcadores moleculares.....	19
2.2.3 Marcadores ISSR	21
2.3 <i>Myrsine umbellata</i> - ESPÉCIE EM ESTUDO.....	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL.....	24
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 OBTENÇÃO E LOCAIS DE COLETA DE <i>Myrsine umbellata</i>	25
4.2 ANÁLISE MOLECULAR	28
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5. RESULTADOS.....	32
5.1 DIVERSIDADE GENÉTICA.....	32
5.2 ESTRUTURA GENÉTICA	36
6. DISCUSSÃO.....	45
6.1 DIVERSIDADE GENÉTICA.....	45
6.2 ESTRUTURA GENÉTICA.....	46
7. CONCLUSÕES.....	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1.INTRODUÇÃO

Em florestas tropicais onde a biodiversidade vegetal é alta, à exemplo da Floresta Atlântica, é inviável estudar a genética de todas as espécies (KAGEYAMA et al., 2003). Dessa forma, estudos genéticos a níveis populacionais ou com determinados conjuntos de espécies permitem interpretar a comunidade e extrapolar os resultados para espécies com características semelhantes, obtendo uma melhor compressão dos padrões (OLIVEIRA; MATTOS, 2014). A amostragem de espécies-modelo em ecossistemas semelhantes utilizando marcadores pode permitir avanços no entendimento genético das populações naturais (SOLÉ-CAVA, 2001).

Myrsine umbellata é um arbusto nativo da Floresta Atlântica, amplamente distribuído neste bioma. A espécie é considerada secundária em processos de sucessão ecológica e facilitadora em áreas de regeneração natural, servindo como poleiro para descanso e abrigo de aves e morcegos (BACKES;IRGANG, 2002). Trata-se de uma espécie dioica, cuja polinização cruzada é obrigatória, e dispersão dos frutos é ornitocórica. Apresenta ocorrência agregada e alta densidade populacional. Portanto, um bom modelo para os estudos de diversidade genética (JUNG-MENDANÇOLLI;BERNACCI, 2005).

Espécies de ampla distribuição geográfica, reprodução por fecundação cruzada e dispersão de sementes por animais apresentam maiores níveis de variabilidade genética (HAMRICK; GODT, 1989). Pela ótica populacional, a distância geográfica e o sistema de cruzamento contribuem para a maior parte da variabilidade genética dentro das populações. Além disso, espécies alógamas possuem maior variação genética dentro de suas populações, que espécies autógamas (RIBEIRO et al., 2010).

O conhecimento da diversidade genética intra e inter populacional é essencial para o entendimento da estrutura genética e para o delineamento de estratégias de conservação e indicadores para monitoramento, manejo, restauração de áreas degradadas, corredores de fluxo gênico, estabelecimento de tamanhos mínimos de reservas e número de matrizes para a coleta de sementes (KAGEYAMA et al., 2003).

A variabilidade genética entre e dentro das populações é dependente de fatores como o sistema reprodutivo, a forma de cruzamento, dispersão de pólen e sementes, os quais permitem explicar o comportamento dos alelos nas populações (BRANDÃO, 2008). Marcadores genéticos, de herança simples, são úteis na detecção de polimorfismos entre indivíduos e populações. Dentre os marcadores, os moleculares são definidos como qualquer tipo de dado molecular que permita um polimorfismo detectável entre os organismos (BUSO et al., 2003), destes os de DNA fornecem informações diretamente sobre o material genético dos indivíduos em estudo, sem sofrer influência ambiental (BORBA et al., 2005).

Segundo Loveless et al.,(1998) espécies alógamas, com polinização zoocórica e dispersão ornitocórica, que possuem capacidade de transpor maiores distância entre as populações, geralmente apresentam baixos níveis de divergência genética entre populações. Neste estudo foi proposto estudar as populações naturais de *M. umbellata* com a hipótese que estas apresentem maior diversidade genética intrapopulacional. Além disto, também será a avaliado o fator de distância genética entre as populações, visando testar a hipótese que populações mais próximas geograficamente tenham maior similaridade genética e que a diferenciação entre populações esteja relacionada ao aumento da distância por inviabilizando o fluxo gênico, culminando no isolamento.

Com esta intenção, neste trabalho foi avaliada a diversidade genética intra e interpulacional de *Myrsine umbellata* em remanescentes da Floresta Atlântica, por ISSR, visando delineamento de estratégias de conservação eficientes, e indicadores para monitoramento e manejo da espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO

A Genética da conservação é o uso da teoria e técnicas da genética a fim de reduzir ou amenizar o risco de extinção de espécies ameaçadas. Seu objetivo em longo prazo é preservar espécies como entidades dinâmicas capazes de se adaptarem às mudanças ambientais (GALLETI et al., 2008).

Derivada da genética de populações, genética evolutiva e da teoria da genética quantitativa, a genética da conservação foca nas consequências que surgem da redução de uma população, uma vez grande e exogâmica, para pequenas unidades onde fatores estocásticos e os efeitos da endogamia são extremamente importantes (AVISE, 2010). Entretanto, estas teorias geralmente concentram-se sobre grandes populações onde a constituição genética é governada por fatores determinísticos (coeficientes de seleção, e etc) (CAVALLARI, 2004).

O Campo da genética da conservação também inclui o uso das análises genéticas moleculares para elucidar aspectos da biologia da espécie relevantes para o seu manejo (CABALLERO et al., 2010). De acordo com Peakall et al., 2003; Renau-Morata et al., 2005 e Avise, 2010, dentre as aplicações da genética molecular podem referir-se o apoio a:

- comprovar se uma população tem baixa diversidade genética ou sofre de erosão genética;
- planejar os efeitos das ações de gestão como a extração ou translocação de indivíduos;
- identificar populações que são especialmente valiosas para a conservação da espécie;
- detectar se, na natureza, espécies ou populações estão a trocar genes entre si;
- determinar a origem populacional dos indivíduos e a que espécies pertencem;
- escolher quais as populações ou indivíduos a usar para reproduzir em cativeiro ou para repovoar novas áreas;

- determinar se as populações estão demograficamente isoladas ou conectadas;
- compreender a importância da diversidade genética para a resistência dos ecossistemas a perturbações.

2.2 ESTUDOS DE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NA FLORESTA ATLÂNTICA

O estudo de genética de populações, com vistas a conservação genética, se faz de grande importância para conhecimento da dinâmica populacional e a partir disso, a proposição de medidas eficazes de manejo em ecossistemas submetidos a ação antrópica (FRANKHAM; BRISCOE, 2008). Um exemplo claro é a Floresta Atlântica.

O Domínio tropical atlântico é composto por um mosaico de vegetações definidas como: florestas ombrófilas densa, aberta e mista; florestas estacionais decidual e semidecidual; campos de altitude, mangues e restingas. Esta composição ambiental faz da Floresta Atlântica um bioma complexo e diverso, considerado como um dos maiores hotspots da biodiversidade mundial e também decretado Reserva da Biosfera pela Unesco e Patrimônio Nacional, na Constituição Federal de 1988 (SOS MATA ATLÂNTICA, 2015).

Originalmente o Domínio tropical atlântico abrangia uma área equivalente a 1.315.460 km² distribuídos ao longo de 17 Estados brasileiros, leste Paraguai e nordeste da Argentina (SOS MATA ATLÂNTICA, 2015). Marcada pelo intenso histórico de colonização e exploração dos recursos naturais, vem sofrendo com os processos de perda de habitat e fragmentação florestal. Além disso, por possuir atualmente uma extensa sobreposição com grandes centros urbanos favorece a acessibilidade aos recursos florestais e facilitam a caça e o desmatamento, dificultando a conservação de seus remanescentes. Apesar de ter grande parte de seus habitats drasticamente reduzidos, restando cerca de 7% da sua cobertura florestal original, a Floresta Atlântica ainda abriga mais de 8000 espécies endêmicas (TABARELLI et al., 2010).

O atual conhecimento sobre as espécies da Floresta Atlântica e sua autoecologia é ainda insuficiente, principalmente quanto à questão da diversidade e estruturação genética populacional de suas espécies e procedimentos adequados de amostragem para fins conservacionistas e de manejo (SOS MATA ATLÂNTICA, 2015). Faz-se necessário um maior número de estudos que caracterizem os eventos relacionados à movimentação dos alelos (sistema reprodutivo, níveis de diversidade e estruturação genética, taxa de cruzamento, fluxo gênico, etc.) em populações naturais, bem como os vetores envolvidos e sua ação. De modo semelhante, a integração dos fatores ligados à estrutura genética e às dinâmicas ecológicas e evolutivas é de fundamental importância na tentativa de definir estratégias efetivas de conservação a fim de garantir a sobrevivência de espécies e populações em longo prazo (KAGEYAMA et al., 2003).

2.2.1 Diversidade e estrutura genética nas populações

O estudo da diversidade genética em populações compreende a descrição dos graus de variabilidade genética mantida dentro das populações e como esta se encontra distribuída entre e dentro das mesmas. Fatores microevolutivos, como deriva genética e seleção, são afetados pela dinâmica das populações, nas plantas, proporcionando modificações na estrutura genética das mesmas (GAIOTTO et al., 2003). Ao longo do tempo, a estruturação genética é resultante dos processos de reprodução, dispersão e da sobrevivência dos indivíduos de uma população. Portanto, é importante mesclar o conhecimento do sistema de acasalamento e reprodução, a história de vida e os fatores ecológicos, pois os mesmos têm papéis importantes na dinâmica evolutiva e ecológica das populações (LOVELESS et al., 1998).

Populações fragmentadas têm exposto algumas determinadas espécies aos efeitos da endogamia e da deriva genética, efeitos que comumente ocorrem em pequenas populações, porém, sem prejuízos para grandes populações (CAVALLARI, 2004). Tais efeitos genéticos estão relacionados com processos estocásticos associados a populações que tiveram seu tamanho reduzido (BOUZAT, 2001). Dessa forma, paisagens que passaram por processo de fragmentação,

formando populações pequenas e isoladas, estão mais sujeitas aos efeitos da endogamia e da deriva genética, apresentando, na maioria das vezes, menor variabilidade genética (WRIGTH, 1931).

Os estudos da estrutura genética, ou seja, a distribuição dos alelos e dos genótipos no espaço e no tempo é fundamentada no teorema de Hardy Weinberg. A teoria conclui que se nenhum fator evolutivo atuar sobre uma população - infinita, panmítica, diploide e de reprodução sexuada- a frequência dos alelos permanece inalterada ao longo das gerações (AVISE, 2010). Assim, a variação genética é condição fundamental para que ocorra evolução, pois a seleção natural atua nas diferenças que ocorrem dentro das populações. Com maior variabilidade genética na população, maiores serão suas chances de sucesso diante das mudanças ambientais (FUTUYMA, 2009).

Sebbenn; Etori, (2001) salientam que a redução contínua no tamanho das populações as submete a perdas de variabilidade genética, por deriva genética. A deriva poderá causar a depressão por endogamia, levando à redução da capacidade adaptativa, da fertilidade, do vigor, do porte e da produtividade (PIERCE, 2011).

Conhecer os padrões de variabilidade genética entre e dentro de populações é um valioso instrumento que poderá ajudar na adoção de práticas mais eficientes, no tocante à conservação, podendo servir de base para técnicas de manejo adequado de fragmentos e fornecer subsídios para medidas de conservação *in situ* (RENAU- MORATA et al., 2005). A base da conservação de espécies é a manutenção da variabilidade genética em populações. Sua descrição e distribuição são fundamentais para o estabelecimento de medidas visando à conservação verdadeiramente eficiente (MOURA, 2005).

A caracterização da variabilidade genética pode ser feita a partir de medidas de diversidade genética intrapopulacional e interpopulacional, que poderão ser estimadas a partir de dados de marcadores moleculares, como a porcentagem de polimorfismo, o índice de fixação, a heterozigosidade esperada no equilíbrio de Hardy-Weinberg, entre outros (HEDRICK, 2005; HARTL; ANDREW, 2007).

2.2.2 A utilização de marcadores moleculares

A diversidade pode ser quantificação por meio da utilização de marcadores morfológicos (os pioneiros), bioquímicos ou moleculares. No final da década de 1960, os estudos de variação genética foram facilitados pelo desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos. Na década de 1980, tais estudos foram impulsionados com o desenvolvimento dos marcadores moleculares baseados DNA (VASCONCELOS, 2002), utilizando a técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR) que foi introduzida, por Saiki et al. (1985), para análise de polimorfismos genéticos a nível de DNA. Os rápidos avanços na biologia molecular forneceram uma série de novos métodos para estudos genéticos de plantas e muitas dessas informações são valiosas em programas conservacionistas e de melhoramento florestal (ESTOPA et al., 2006).

São muitos os métodos utilizados para avaliar a estrutura genética de populações e verificar o grau de variabilidade existente em uma dada espécie. Com o avanço em melhorias nas técnicas de biologia molecular, é possível observar polimorfismo diretamente na sequência gênica de organismos, abrindo novas perspectivas para pesquisa em conservação. Entre elas, podem ser mencionadas as técnicas de microssatélites, RAPD, AFLP, ISSR entre outras (KOZEN, 2014).

Conforme a Tabela 1 pode-se observar que diversos estudos genético-populacionais envolvendo famílias como: Meliaceae, Rutaceae, Bromeliaceae, Leguminosae, Sapotaceae, Fabaceae, Araceae, Myrtaceae, Passifloraceae, Flacourtiaceae, Orchidaceae, Lauraceae, Rubiaceae, Iridaceae, Moraceae, Cyperaceae, Primulaceae entre outras (de 2000 até o atual ano), foram realizados visando conhecer a diversidade e a estrutura genética de populações naturais na Floresta Atlântica.

Com vistas ao manejo e à conservação genética de espécies, esses trabalhos contribuem para o conhecimento da estrutura genética e é importante para populações de plantas que serão selecionadas para conservação ou coleta para programas de melhoramento (MOURA, 2005). Este conhecimento também é importante em estratégias amostrais de populações naturais para a obtenção de amostra representativas da diversidade populacional ou da espécie (VIEIRA, 2005).

Tabela 1- Estudos genético-populacionais realizados para espécies da Floresta Atlântica, utilizando diferentes marcadores.

Espécie	Família	Referência	Marcador
<i>Cabralea canjerana</i>	Meliaceae	MELO et al., 2014	SSR
<i>Esenbeckia leiocarpa</i>	Rutaceae	FORTI et al., 2014	SSR
<i>Aechmea fulgens</i>	Bromeliaceae	ALMEIDA et al., 2012	SSR
<i>Copaifera langsdorffii</i>	Leguminosae	MARTINS et al., 2008	SSR
<i>Dalbergia nigra</i>	Fabaceae	BUZATTI et al., 2012	SSR
<i>Inga vera</i>	Leguminosae	NETO ET al., 2014	SSR
<i>Manilkara maxima</i>	Sapotaceae	GANZHORN et al., 2015	SSR
<i>Metrodorea nigra</i>	Rutaceae	MORAES et al., 2015	SSR
<i>Monstera adansonii</i>	Araceae	ANDRADE et al., 2007	AFLP
<i>Parapiptadenia rigida</i>	Leguminosae-Mimosoideae	SOUZA et al., 2013	AFLP
<i>Trichillia pallida</i>	Meliaceae	ZIMBACK et al., 2004	RAPD
<i>Passiflora alata</i>	Passifloraceae	LOSS et al., 2006	RAPD
<i>Casearia sylvestris</i>	Flacourtiaceae	SILVA et al., 2006	RAPD
<i>Dalbergia nigra</i>	Fabaceae	JUCHUM et al., 2007	RAPD

Continuação da tabela 1

Espécie	Família	Referência	Marcador
<i>Cattleya labiata</i>	Orchidaceae	PINHEIRO et al., 2012	RAPD
<i>Sorocea bonplandii</i>	Moraceae	RUSCHEL et al., 2009	Aloenzima
<i>Cryptocarya moschata</i>	Lauraceae	MORAES et al., 2004	Isoenzima
<i>Cyperus ligularis</i>	Cyperaceae	OLIVEIRA e ISEPON, 2009	ISSR
<i>Carapichea ipecacuanha</i>	Rubiaceae	OLIVEIRA et al., 2010	ISSR
<i>Cattleya granulosa</i>	Orchidaceae	FAJARDO et al., 2011	ISSR
<i>Sisyrinchium micranthum</i>	Iridaceae	TACUTIÁ et al., 2012	ISSR
<i>Aechmea fulgens</i>	Bromeliaceae	ALMEIDA et al., 2012	ISSR
<i>Cattleya labiata</i>	Orchidaceae	PINHEIRO et al., 2012	ISSR
<i>Melanoxyl lonbrauna</i>	Fabaceae	VASCONCELOS et al., 2012	ISSR
<i>Erythrina velutina</i>	Fabaceae	GONÇALVES et al., 2014	ISSR
<i>Myrsine coriacea</i>	Primulaceae	PAULA, 2014	ISSR
<i>Psychotria hastisepala</i>	Rubiaceae	SILVA et al., 2014	
<i>Metrodorea nigra</i>	Rutaceae	MORAES et al., 2015	ISSR

2.2.3 Marcadores ISSR

O marcador *Inter Simple Sequence Repeats* (Intersequências simples repetidas) ou ISSR é amplamente utilizado (SALEH et al., 2011). Foram desenvolvidos com base nos SSR (ZIETJIEWICZ et al., 1994) e popularizado com o trabalho de Wolfe et al., 1998.

Muitos trabalhos utilizam os microssatélites, ou sequências simples repetidas (SSR), que são pequenas sequências nucleotídicas variando de 1 a 6 bases distribuídas ao longo do genoma, repetidas em *tandem*. Essas sequências são frequentemente encontradas e dispostas ao acaso no genoma dos eucariotas. Os locos de SSR se difundiram entre pesquisadores, porém, o uso deste marcador requer o conhecimento prévio da sequência que flanqueia o SSR para que os *primers*, utilizados na reação de PCR (LIU; WENDEL, 2001), sejam construídos. Descobrir e caracterizar um número grande de SSR é demorado, além de ser um processo oneroso (NYBOM, 2004).

Com o uso dos ISSR a problemática da informação prévia das sequências que flanqueiam o microssatélite, foi contornada (RAKOCZY-TROJANOWSKA, 2004). Em adição, a análise de ISSR é tecnicamente simples em comparação com outros tipos de marcadores. O método proporciona alta reprodutibilidade dos resultados e gera abundante polimorfismo em muitos sistemas. De modo semelhante aos RAPDs, a utilização de marcadores ISSR se torna fácil e rápido de se trabalhar, além de proporcionarem um grande número de fragmentos polimórficos e constituírem uma técnica que é relativamente menos onerosa. Entretanto, para estudos de genética de populações, uma desvantagem dos marcadores ISSR é a sua dominância (GEORGE, 2009; RODRIGUES, 2011).

Os *primers* ISSR apresentam maior robustez, devido a sua maior superfície de ancoramento e possuem maiores temperaturas de anelamento, aumentando a reprodutibilidade dos produtos de ISSR (HARRIS, 1999). O ISSR é considerado um marcador semi-arbitrário, ampliado por PCR em presença de oligonucleotídeos complementares para o microssatélite designado, podendo ser ancorado no final 3' ou 5' com 1 a 4 bases de purina ou pirimidina. As sequências-alvo dos ISSRs são abundantes ao longo do genoma de eucariontes e evoluem rapidamente. Portanto, ISSR tem provado ser útil em estudos de genética de populações (SHARMA et al., 2012).

Em ISSR, um único *primer* é usado na amplificação do DNA, gerando múltiplos fragmentos que possuem comprimentos variados (SLOTTA; PORTER, 2006). Para separação e visualização dos produtos da amplificação, a partir da técnica de ISSR, poder empregar-se tanto a eletroforese em gel de agarose e detecção com brometo de etídeo ou eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração com nitrato de prata (SHARMA et al., 2012).

Marcadores ISSR têm sido usados em diversos estudos para análise de variabilidade entre linhas híbridas de cultivares, complexos híbridos naturais (SLOTTA; PORTER, 2006; XIAO et al., 2006; GRATIVOL et al., 2011; JIA et al., 2011; PINHEIRO et al., 2012). Mas, o número de estudos de estudos de genética de populações, especialmente para verificar a diversidade genética, utilizando marcadores ISSR, para a Floresta Atlântica são poucos (Tabela 1).

2.3 *Myrsine umbellata*- ESPÉCIE EM ESTUDO

Myrsine umbellata Mart. é uma espécie dioica, conhecida popularmente como capororoca, capororoca-branca, pororoca, capororoca-de-folha-grande, jacaré-domato (JUNG-MENDANÇOLLII; BERNACCI, 2006), nomes que em tupi-guarani, segundo Backes; Irgang, (2002), significa a “árvore que estala”. Os autores relatam que a espécie possui uma importância ecológica por conseguir se estabelecer em áreas descampadas e em ambientes extremos, sendo considerada como uma espécie pioneira, por diversos autores. É indicada para a recuperação de áreas degradadas de campo ou de vegetação secundária. Produz anualmente um número abundante de sementes viáveis que são amplamente disseminadas por aves, à exemplos de sabiás, tucanos, jacus, gralhas (LORENZI, 2002). A semente é de fácil germinação, podendo ser facilmente utilizada em qualquer tipo de solo, após os frutos passarem pelo tubo digestivo dos animais que os consomem.

Essa espécie possui casca cinzenta-esverdeada, grossa, verrugosa, com fissuras longitudinais. As folhas são simples, coriáceas, alternas, de cor verde-escura, sendo mais claras na face inferior. Suas flores são pentâmeras, unissexuais e pequenas. Os frutos são do tipo drupa, esféricos de até 6,5 mm de diâmetro, de cor roxa (LORENZI, 2002). A madeira produzida por *M. umbellata* possui coloração castanho-rosado, de valor secundário, utilizada na construção civil para obras internas. Presta-se para lenha e carvão. A casca é uma importante fonte de tanino, assim como a superfície abaxial de suas folhas que apresentam canais e pequenas pontuações, acumulando terpenos e taninos (MAUSETH, 1988). Seu decocto já foi considerado, segundo Backes; Irgang, (2002), remédio contra a lepra.

Em relação à fenologia dos indivíduos de *M. umbellata*, Lorenzi (2002) e Backes; Irgang, (2002) em seus trabalhos afirmam que a espécie floresce durante os meses de dezembro a janeiro e de junho a julho. A frutificação ocorre de março a dezembro. É uma espécie perene, que ocupa prioritariamente faixas entre 400 a 1200 metros de altitude. Sabe-se ainda que plantas perenes, à exemplo e *M. umbellata*, podem apresentar quantidades mais elevadas de fenol, tendo em vista que tais compostos permanecem nas folhas por tempos mais longos (CARVALHO, 2006).

Pouco se conhece sobre o gênero *Myrsine* na Floresta Atlântica, (PAULA, 2014) Assim, estudos genético populacionais para essa espécie devem ser propostos. Além disso, por ocorrer em toda extensão de Floresta Atlântica, *M. umbellata* e pelas características intrínsecas a espécie, apresenta-se como um modelo potencial para estudos da diversidade e estrutura genética de populações para que esses dados possam ser aplicados a outras espécies com padrões semelhantes.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a diversidade genética de *Myrsine umbellata* em remanescentes de Floresta Atlântica.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- 1) Analisar diversidade genética intrapopulacional e interpopulacional de *M. umbellata* com base em marcadores ISSR;
- 2) Inferir sobre o fluxo gênico e a estruturação das populações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E LOCAIS DE COLETA DE *Myrsine umbellata*

Folhas jovens saudáveis de *M. umbellata* (Figura 1) foram coletadas no período agosto-dezembro de 2014. As expedições de campo foram realizadas

através da licença de coleta emitida pelo Instituto Chico Mendes. A área de coleta foi dividida em seis populações (Figura 2), localizadas em afloramentos rochosos de Floresta Atlântica no estado do Espírito Santo.

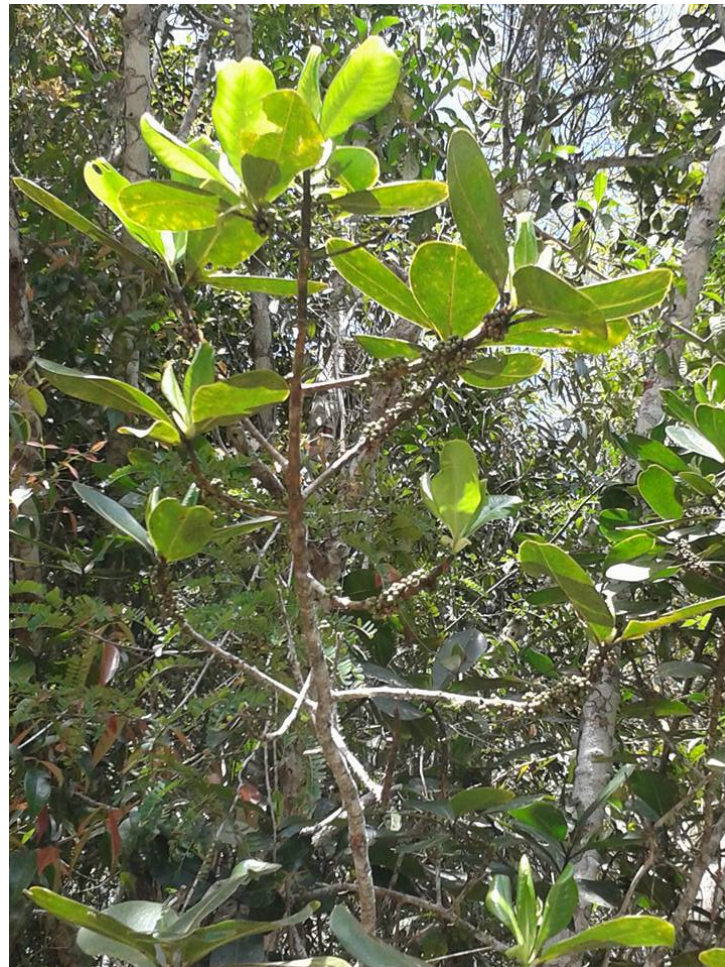


Figura 1- Aspecto geral de *M. umbellata* coletada na população de Santa Teresa, evidenciando o ramo.

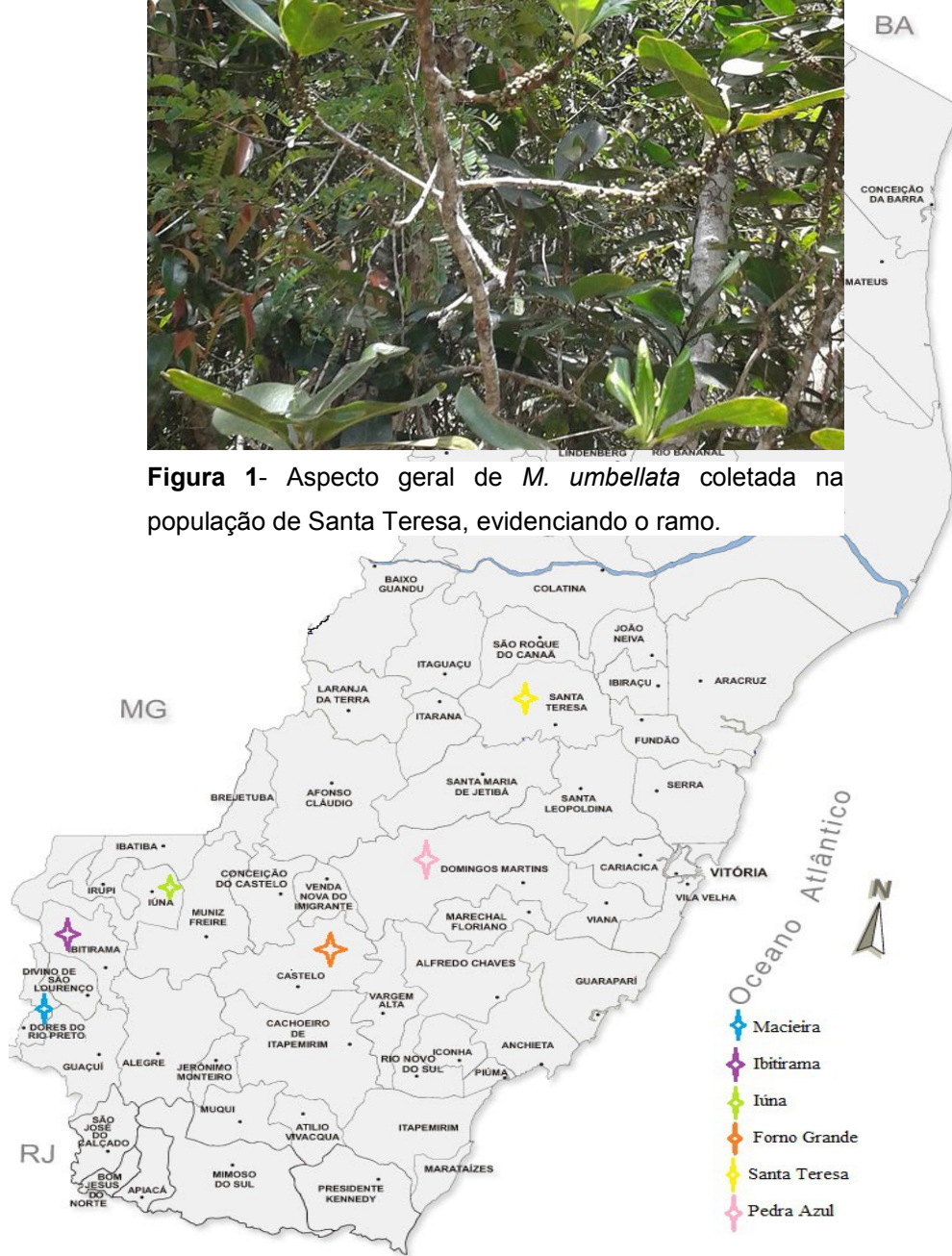


Figura 2- Mapa de localização dos pontos de coletas. Os Municípios de Dorés do Rio Preto (Macieira) e Ibitirama pertencem ao Parque Nacional do Caparaó; Iúna, Castelo (PE do Forno Grande) a região sul, Domingos Martins (PE Pedra Azul) a região sudoeste-serrana e Santa Teresa a central-serrana.

As áreas de coleta foram escolhidas com base em um estudo prévio, em que a ocorrência de *M. umbellata* foi constatada nesses locais. As seguintes populações de acordo com as suas localidades foram amostradas. Para enfatizar as populações Macieira e Ibitirama estão alocadas no Parque Nacional (PARNA) do Caparaó no sul do Espírito Santo (Tabela 2). As populações de Iúna e PE Forno Grande também se localizam na região sul. As populações de Santa Teresa e PE Pedra Azul localizam-se nas regiões central-serrana e sudoeste-serrana, respectivamente.

Tabela 2- Coordenadas geográficas, altitude e número de indivíduos de cada população amostrada.

População	Latitude	Longitude	Altitude	Nº de indivíduos
Macieira (Dores do Rio Preto.	20°59'23"S	77°30'46"W	1495	9
Ibitirama	20°23'78"S	41°44'12"W	1074	9
Iúna	24° 16' 54"S	77°43'83"W	1577	9
PE Forno Grande (Castelo)	20°51'66"	41°08'89"W	1307	12
Santa Teresa	03°40'00"S	77°91'12"W	623	14
PE Pedra Azul (Domingos Martins)	02°88'71"S	77°42'98"W	1250	10
Total de indivíduos				63

As amostras foliares foram armazenadas individualmente em sacos de papel, seladas e identificadas.

4.2 ANÁLISE MOLECULAR

O DNA genômico total foi isolado e purificado utilizando a metodologia de extração de Doyle e Doyle (1990), com modificações. As folhas foram maceradas em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. Aproximadamente 200 mg do pó obtido foi transferido para microtubos de 2 mL, previamente identificados. Em cada amostra, foi utilizado 650 µL de tampão de extração possuindo a seguinte composição: 2% v / v de CTAB, 1,4 mol / L de NaCl₂, 20 mmol / L de EDTA, 100

mmol / L de Tris-HCl pH 8,0; 2% w / v de polivinilpirrolidona sólido e 0,2% v / v β -mercaptoetanol.

A mistura foi homogeneizada em vortéx durante 20 segundos e incubadas em banho seco a 65 ° C com agitação durante 45 minutos. Posteriormente foi esfriada a temperatura ambiente e realizadas duas lavagens com clorofórmio: álcool isoamílico pelo o seguinte procedimento: foi adicionado um volume de 600 μ L da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) os microtubos foram suavemente homogeneizados e microcentrifugados por 10 minutos a 12000 rpm, em seguida, a fase superior foi transferida para outros tubos. Foi adicionado um volume igual ao sobrenadante de isopropanol gelado e acetato de amônio ($C_2H_7NO_2$) na proporção 1:3. Os microtubos foram suavemente agitados e incubados a - 20 °C por uma noite.

Após esta etapa, todas as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 12000 rpm, e o sobrenadante removido, o precipitado foi lavado duas vezes com álcool 70% e microcentrifugado por 5 minutos a 14000 rpm, o pellet foi seco em banho seco a 65° por 15 minutos. Este precipitado foi ressuspenso em 100 μ L de TE (10 mmol/L de Tris-HCl, 1mmol/L de EDTA a pH 8.0), contendo RNase na concentração final de 50 μ g/mL e incubado em banho seco a 37 °C por 30 minutos. A partir da extração, foi realizada a quantificação de DNA por eletroforese em gel de agarose 0,8% para observação do nível de oxidação presente no DNA, e quantificação da concentração e pureza no espectrofotômetro NanoDrop 2000 *ThermoScientific*. A partir da quantificação as amostras de DNA foram diluídas a concentração de 10 ng/ mL.

De 32 iniciadores ISSR da Universidade de British Columbia, em Vancouver, Canadá, 10 *primers* foram selecionados para este trabalho, de acordo com o maior número de fragmentos polimórficos apresentados e qualidade de amplificação. As condições de amplificação foram: volume total de 20 μ L contendo 8:33 mM de Mix de enzima para PCR (Promega®) 1X, 0,5 μ M de *primer*, 1 unidade de Taq polimerase e 60 ng de DNA.

As condições de amplificação foram: desnaturação 5 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos na fase de um minuto a 94 °C; 1 minuto a 55 °C e 1 minuto a 72 °C, com uma fase final de extensão 2 minutos a 72 °C. Os fragmentos obtidos a partir das reações de PCR foram separados por eletroforese em gel horizontal de agarose a 1,5% contendo 0,02 μ L/mL de brometo de etídio e TBE tampão de corrida (Tris-

base, ácido bórico e EDTA), a 90 volts por aproximadamente 1 hora e 15 minutos. Posteriormente, os géis foram fotografados sob luz UV utilizando em sistema de fotodocumentação.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada considerando apenas bandas apresentando amplificação consistente, que foram como presente (1) e ausentes (0).

Foi calculado o índice de Shannon (LEWONTIN, 1972), para medir a diversidade genotípica de uma população. Define-se a estatística de Shannon- como:

$$H = - \sum P_i \ln(P_i)$$

Em que,

P_i -é a frequência do i-ésimo genótipo.

n- tamanho da amostra ou número de indivíduos da população i.

Calculou-se também o Índice de Diversidade de Nei (NEI, 1973), que possibilita obter a medida do grau de diferenciação genética entre populações. Este método é baseado nas identidades e dois genes escolhidos ao acaso dentro e entre populações e independente do número de alelos. Segundo Robinson, (1998) a equação de Nei pode ser aplicada a diferentes níveis de classificação hierárquica, como populações dentro de uma região geográfica, subpopulações dentro de populações, etc., utilizando-se em cada caso, as frequências alélicas. Nei (1973,1978) determinou que a probabilidade de identidade e não identidade gênica de dois genes escolhidos ao acaso é dada por:

$$J_i = \sum_k p_{ijk}^2 \quad \text{e} \quad H_i = 1 - J_i ,$$

A probabilidade de não identidade, H , portanto, é igual ao complemento aritmético da identidade gênica, o que é usualmente denominado de Heterozigosidade.

As estimativas de fluxo gênico entre as populações foram obtidas segundo a equação proposta por Crow e Aoki (1984):

$$Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{st}} - 1 \right)$$

Em que:

Nm é o número de migrantes

F_{st} é uma medida de diferenciação entre populações

$k = [p/(p - 1)]^2$, sendo p o número de populações.

O Índice de Shannon, Índice de diversidade de Nei, e as estimativas de fluxo gênico foram calculados utilizando-se o software Popgene (Population Genetic Analysis) versão 1.31 (YEH et al., 1999).

As estimativas de dissimilaridade genética foram realizadas de acordo com o complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, organizado em matrizes para análise de agrupamento pela ligação média entre grupos UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average) para obtenção dendrogramas das populações e dos indivíduos, assim como gráficos de projeções 3D no plano cartesiano. A diferenciação da variabilidade genética entre e dentro das populações e a distância entre os pares das populações foram avaliadas pela análise de variância molecular AMOVA (EXCOFFIER et al., 1992). Foi feita também uma AMOVA com a estatística Φ , um análogo a estatística F de Wrigth, para analisar par a par os valores de Φ_{ST} das populações. Esse parâmetro Φ_{ST} se refere à probabilidade de se amostrar dois alelos de uma população e eles serem idênticos por descendência, utilizando o conjunto de populações como referência. Todas essas análises de divergência genética, de agrupamento e gráficos foram realizados com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2013).

Foi utilizado o Software Structure 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2007) que realiza uma análise Bayesiana, conduzida a partir de simulações de

Monte Carlo via Cadeias de Markov e (MCMC) para avaliar a estrutura populacional utilizando genótipos multilocus dos indivíduos, para detectar grupos genéticos (K) prováveis, assumindo o modelo de populações mistas, para marcadores dominantes. Como uma ajuda para identificar o número de grupos de indivíduos (K), os resultados gerados foram analisados por meio da versão 6.7 do Structure Harvester (EARL, 2012), de acordo com o método de Evanno et al (2005).

5. RESULTADOS

5.1 DIVERSIDADE GENÉTICA

Os 10 *primers* ISSR testados mostraram-se adequados, produzindo fragmentos robustos, de boa intensidade, com bom perfil de amplificação. Foram amplificados 129 locos, dos quais 91 polimórficos (Tabela 3).

Tabela 3- Análise descritiva dos primers com respectivas sequências, número total de bandas, número de bandas polimórficas e porcentagem de polimorfismo.

<i>Prime rsUB C</i>	Sequencia (5'-3')	Nº total de bandas	Nº de bandas polimórficas	% de polimorfismo
849	GTG TGT GTG TGT GTG TYA	5	5	100
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	16	16	100
834	AGA GAG AGA GAG A GA GYT	18	18	100
810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	16	16	100
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	11	11	100
880	GGA GAG GAG AGG AGA	10	10	100
842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	16	14	87,5
840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	15	15	100
878	GGA TGG ATG GAT GGA T	12	12	100
859	TGT GTG TGT GTG TGT GRC	10	10	100
Total		129	91	

em que: R = purina (A ou G) e Y = pirimidina (C ou T).

Todos os *primers* apresentaram elevadas porcentagens de polimorfismo (Tabela 3) Os *primers* apresentaram de 5 a 18 bandas e entre 87,5 a 100% de bandas polimórficas. O alto polimorfismo encontrado pode ser observado na figura 3, onde são apresentados os indivíduos amostrados.

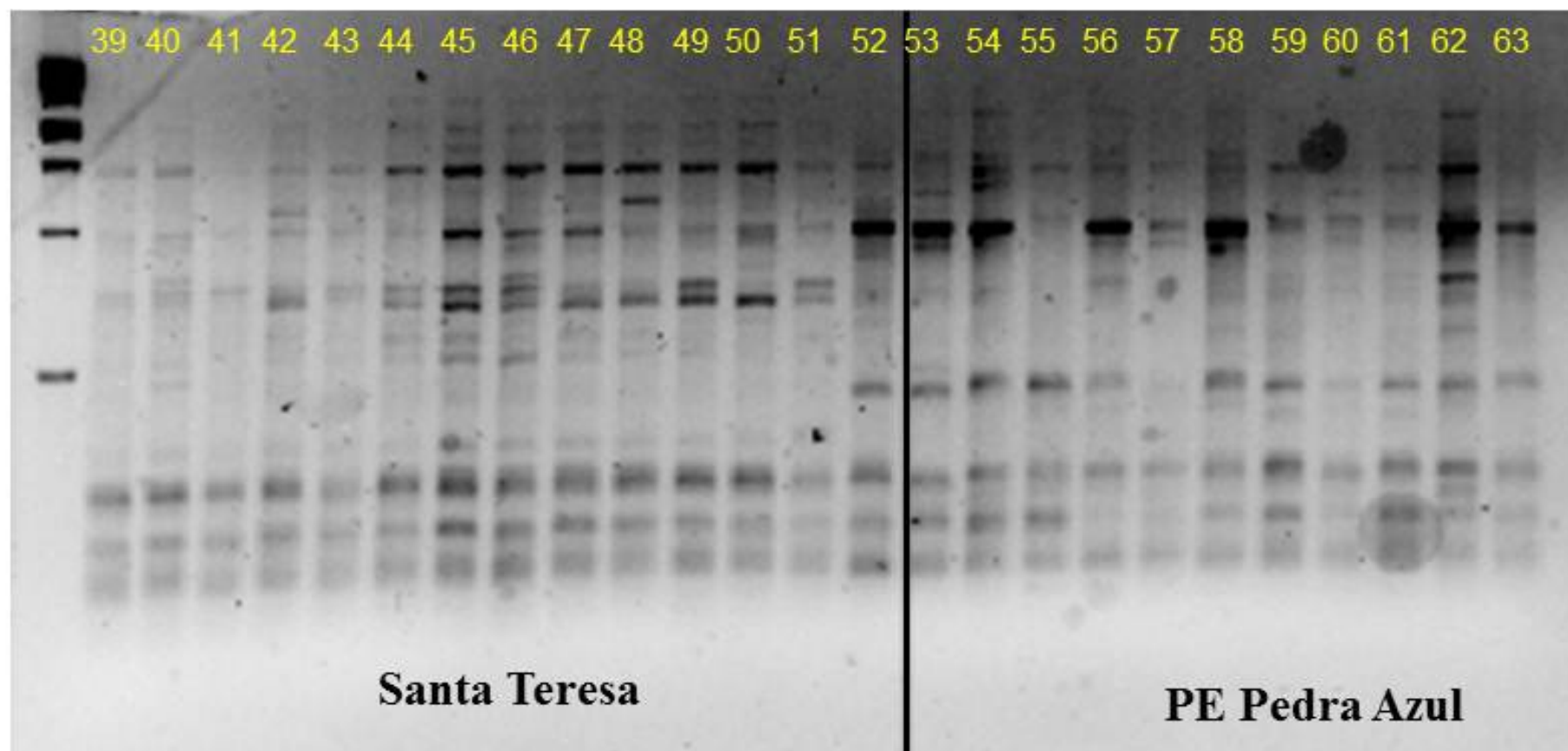


Figura 3- Fotografia do gel de agarose, mostrando o perfil dos fragmentos produzidos pelo *primer* 834 em indivíduos (39 a 63) de *M. umbellata* das populações de Santa Teresa e PE Pedra Azul. Marcador: 1Kb.

O alto polimorfismo indica a elevada diversidade genética nos indivíduos estudados. Considerando a análise intrapopulacional também foi observada altas porcentagens de polimorfismo intrapopulacionais (Tabela 4), sendo os maior valor para PE Forno Grande (92%) e o menor para PE Pedra Azul (79,3%).

Tabela 4- Polimorfismo populacional por ISSR.

Populações	N.I.	N. t. l.	N. l. m	% de Polimorfismo	Índice de diversidade de Nei (Hi)	Índice de Shannon- Wiener (H')
Macieira (1)	10	95	13	86,31	0,28	0,18
Ibitirama(2)	10	63	11	82,5	0,18	0,12
Iúna(3)	9	75	10	86,6	0,22	0,14
PE Forno Grande(4)	12	75	6	92	0,24	0,15
Santa Teresa(5)	14	83	15	81,9	0,22	0,13
PE Pedra Azul(6)	10	92	19	79,3	0,23	0,15

N.I.= Número de indivíduos; N. t. l.= Número total de locos; N. l. m.= Número de locos monomórficos.

Os índices de diversidade genética dos indivíduos foram obtidos a partir de 129 locos e testados para as seis populações (Tabela 4). Para o índice de Shannon-Wiener, de acordos com os valores obtidos a maior riqueza ou variabilidade, em termos de variação genotípica, é encontrada na População da Macieira, cujo valor de H' é estimado em 0,18. O menor valor encontrado é relativo à população de Ibitirama, que apresentou um valor de diversidade genotípica de 0,12. O índice de diversidade genética de Nei, calculado para as populações, variou de 0,18 a 0,28, sugerindo um alto índice de diferenciação genética (SHAH et al., 2008). Dessa forma, de acordo o Nei (1973), a populações da Macieira apresentam o maior valor de heterozigosidade enquanto a populações de Ibitirama, apresenta o menor valor.

5.2 ESTRUTURA GENÉTICA

O valor de Fluxo gênico encontrado no trabalho foi de 1,24 indivíduos por geração entre populações, considerado segundo os autores Shah et al., (2008), alto fluxo gênico.

As similaridades genéticas variaram de 0,50 (entre a população de Ibitirama e a população de Iúna) e 0,68 (entre as populações de Iúna e Pedra Azul) (Tabela 5). A média indica que as populações geneticamente mais divergentes das populações restantes são Santa Teresa e a população do PE Pedra Azul, com média semelhante de 0,64.

Tabela 5- Matriz genética de dissimilaridade entre populações, por meio do índice de dissimilaridade de Jaccard.

	Macieira (1)	Ibitirama (2)	Iúna (3)	Forno Grande (4)	Santa Teresa (5)	Pedra Azul (6)
1	0	0,59	0,64	0,61	0,65	0,62
2		0	0,50	0,56	0,63	0,64
3			0	0,57	0,67	0,68
4				0	0,65	0,65
5					0	0,61
6						0
Médias	0,62	0,58	0,61	0,60	0,64	0,64

Com os dados obtidos na matriz representada na tabela 5, foi realizado um agrupamento entre as populações pelo método UPGMA (Figura 4). A estimativa de correlação cofenética foi alta (0,92) e houve a formação de dois grupos.

De acordo com o que se pode observar na figura 4, as populações pertencentes ao PARNA do Caparaó agruparam – se (Macieira e Ibitirama)

juntamente com Iúna e a População do Parque Estadual do Forno Grande. Já as populações de Santa Teresa e Pedra Azul ficaram em outro agrupamento.

A projeção das distâncias no plano cartesiano 3D, apresentada na figura 5, corroborou com os resultados do agrupamento de populações (Figura 4). Pode-se observar na figura 4, a formação de dois agrupamentos. A população da Macieira foi a que apresentou um maior distanciamento relativo das populações do seu agrupamento. A população de Santa Teresa, pertencente ao outro agrupamento foi a que ficou mais próxima das populações de Macieira, Ibitirama, Iúna e PE Forno Grande.

Esses resultados também podem ser observados com os dados de dissimilaridade apresentados na tabela 5, em que população da Macieira apresenta maiores valores de dissimilaridade em relação as demais populações do mesmo agrupamento (0,59, 0,64, 0,61 com Ibitirama, Iúna e PE Forno Grande), estando dessa forma, mais distante geneticamente das outras do mesmo grupo. A população de Santa Teresa apresenta valores menores de dissimilaridade com as outras populações, pertencentes ao outro agrupamento, do que a população de PE Pedra Azul.

Na análise da AMOVA realizada, considerando dois níveis hierárquicos, foi significativa tanto para 0,01% como para 0,1% nas seis populações. A variação dentro das populações foi maior (67,41%) que entre (32,58%) (Tabela 6).

Tabela 6- Análise de variância molecular (AMOVA) para as seis populações de *M. umbellata*. GL = graus de liberdade, SQ = soma do quadrado dos desvios, % = porcentagem de variação e Pv = Valor de P.

FV	GL	SQ	%	Pv
Entre	5	359.46	32.58	0,01**
Dentro	57	678.34	67.41	0,01**
Total	62	1037.80	100.00	
ØST	0,32			

Estimativas de Θ_{ST} menores que 0,05 indicam pouca diferenciação genética, valores entre 0,05- 0,15 indicam moderada diferenciação genética e estruturação populacional. Estimativas acima de 0,25 indicam elevada diferenciação genética (HARTL; CLARK, 1997). De acordo com os resultados encontrados na Tabela 6, a estimativa de Θ_{ST} foi 0,32, evidenciando uma estruturação genética das populações. Ao analisar pares de populações (Tabela 7) os valores de Θ_{ST} foram significativos para os pares de populações ($p > 0,05$) e ficaram entre 0,11 e 0,40, evidenciando que as populações estão geneticamente estruturadas apresentando um alto nível de diferenciação genética em 0,40. As menores variâncias foram detectadas entre as populações de Ibitirama e Lúna com a menor porcentagem de variância (11,11 %) e consequentemente maior de variância dentro (88,88%). E as maiores, entre Ibitirama e PE Pedra Azul 40,96% entre e 59,03 dentro.

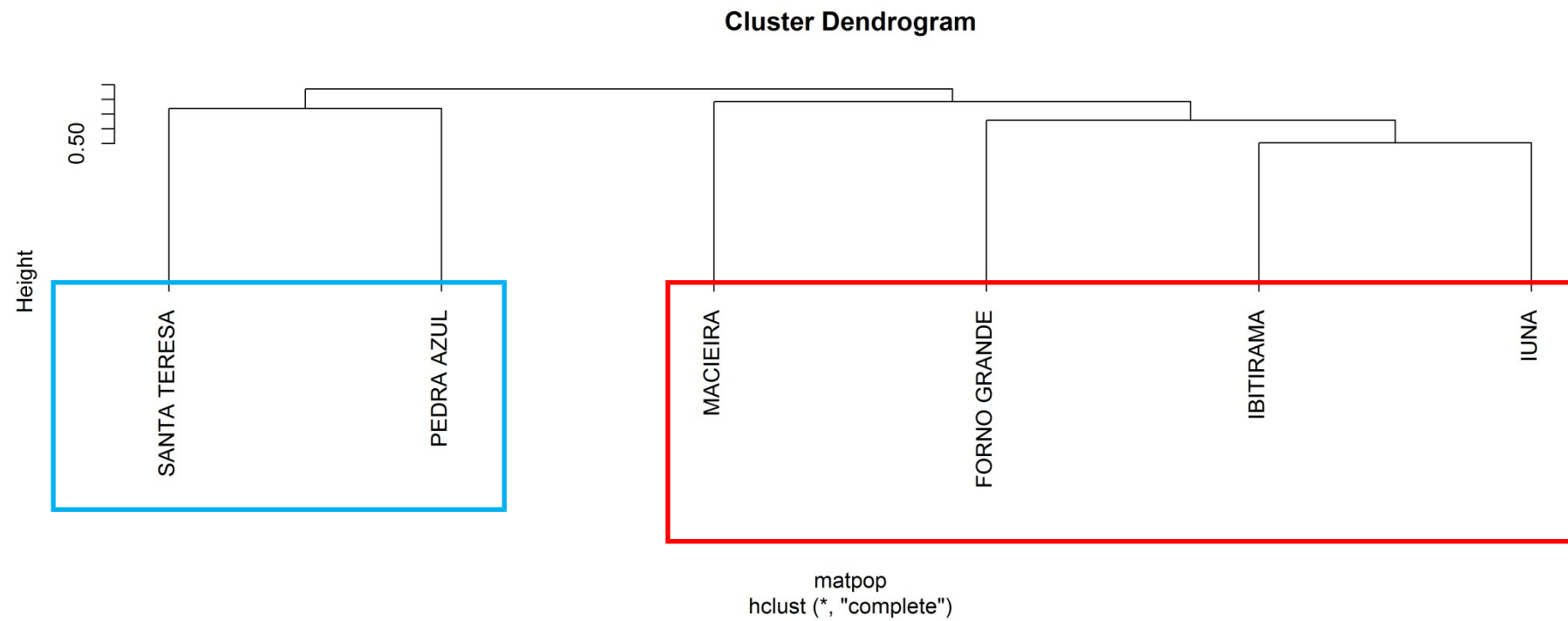


Figura 4- . Dendrograma representativo da dissimilaridade genética obtidas com base em marcadores ISSR, utilizando o índice de Jaccard, baseada no método UPGMA para as 6 populações de *M.umbellata*

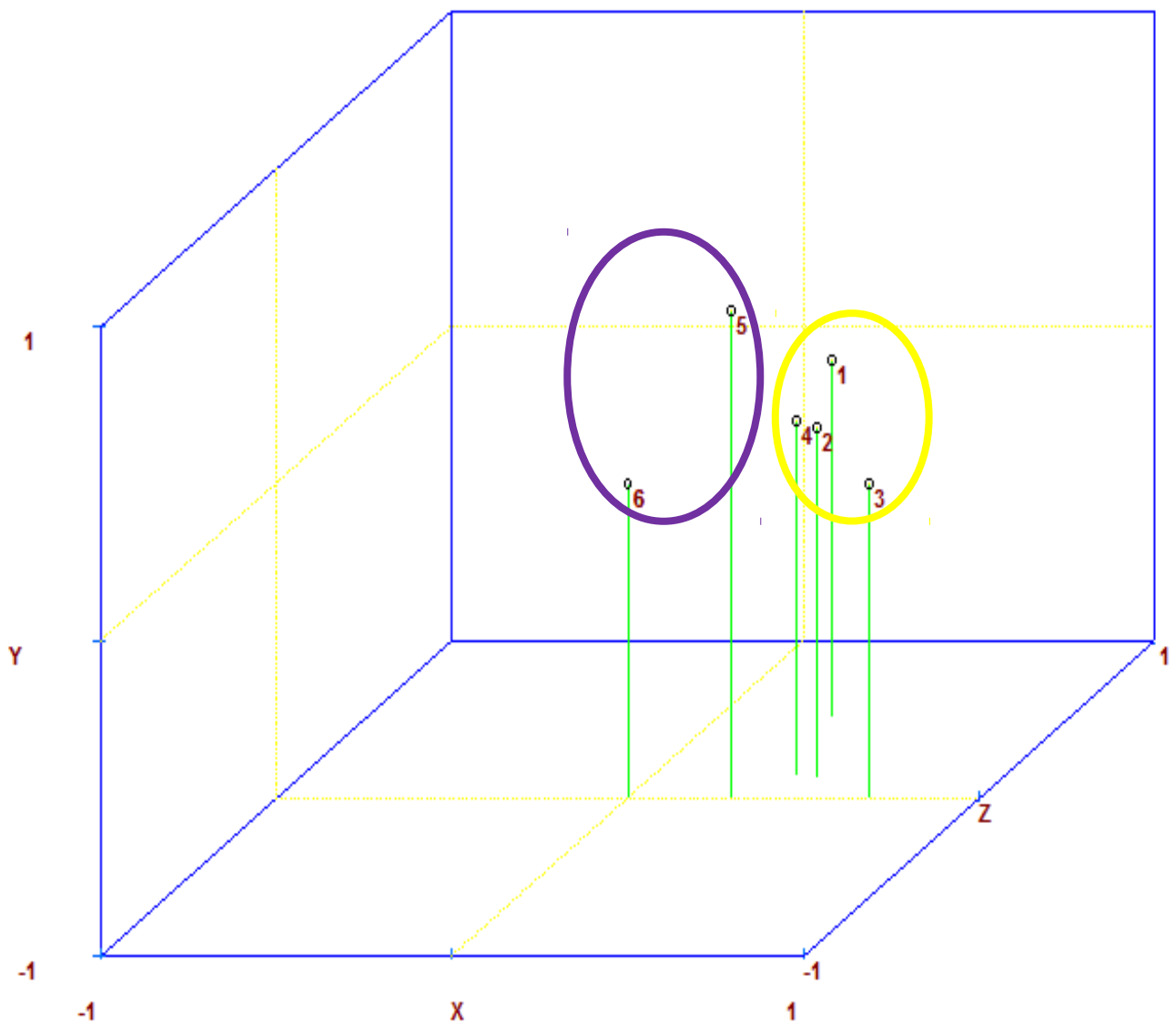


Figura 5- Representação tridimensional da distribuição das populações em plano cartesiano. População 1- Macieira, População 2- Ibitirama, População 3- Iúna, População 4- PE Forno Grande, População 5- Santa Teresa e População 6- PE Pedra Azul.

Tabela 7- Estimativas de Variância entre os pares de população e estatística ØST.

P. P	E. V. E. P.	E. V. D. P.	% V. E.	% V. D.	ØST
Macieira e Iúna	4,8	12	28,64	71,35	0,28
Macieira e Iúna	5,11	13,76	27,11	72,88	0,27
Macieira e PE Forno Grande	4,24	13,32	24,14	75,85	0,24
Macieira e Santa Teresa	7,13	13,09	35,28	64,71	0,35
Macieira e PE Pedra Azul	6,39	14,12	31,16	68,83	0,31
Ibitirama e Iúna	1,32	10,57	11,11	88,88	0,11
Ibitirama e Iúna	3,16	10,74	22,73	77,26	0,22
Ibitirama e PE Pedra Azul	6,81	10,63	39,06	60,93	0,39
Ibitirama e	7,71	11,11	40,96	59,03	0,4
Iúna e PE Forno Grande	1,98	12,13	14,02	85,97	0,14
Iúna e Santa Teresa	6,31	11,95	34,57	65,42	0,34
Iúna e PE Pedra Azul	7,78	12,77	37,86	62,13	0,37
P E Forno Grande e Santa Teresa	6	11,87	33,58	66,41	0,33
P E Forno Grande e PE Pedra Azul	6,44	12,52	33,97	66,02	0,33
Santa Teresa e PE Pedra Azul	6,15	12,33	33,28	66,71	0,33

P.P= Pares de Populações; E. V. D. P.= Estimativa da Variância entre Populações; E. V. D. P.= Estimativa da Variância dentro de populações; % V. E. P= Porcentagem de Variância entre Populações; % V. D. P= Porcentagem de Variância dentro de Populações.

A similaridade genética intrapopulacional também foi demonstrada em uma análise considerando todos os indivíduos independentes das populações (Figura 6), originando dois grupos principais, em que a maioria dos indivíduos agrupou-se segundo a sua origem.

No agrupamento que reuniu dos indivíduos das populações Macieira, Ibitirama, Lúna e PE Forno Grande, alguns indivíduos foram agrupados fora de sua população original. A saber: na população do PE Forno Grande os indivíduos 30, 34 e 42 foram os mais variantes, agrupando-se fora da sua origem, próximo aos indivíduos da população de Lúna. Já na população de Ibitirama, apenas o indivíduo 12 agrupou-se próximo aos indivíduos da população de Lúna (Figura 6). Percebe-se a existência de populações, sem um agrupamento claro, com seus indivíduos compartilhando características genéticas com outras populações, por exemplo, a populações de Lúna. Essa população foi a mais divergente, que teve seus indivíduos dispersos entre as populações de Ibitirama e PE Forno Grande. Por outro lado as populações de Ibitirama e PE Forno Grande mesmo apresentando características partilhadas pode-se perceber mais homogeneidade. Todos os indivíduos da população da Macieira ficaram agrupados em sua população original.

O outro agrupamento formado foi composto pelas populações de Santa Teresa e PE da Pedra Azul. Todos os indivíduos dessas populações alocaram-se juntamente com os outros indivíduos de suas populações de origem.

A avaliação feita pelo programa STRUCTURE obteve o número de $K=2$ (Figura 7a). À medida que o K aumenta percebe-se que as populações podem partilhar ainda mais alelos (Figura 7b). Existem populações com indivíduos que compartilham características genéticas com outras populações, confirmando os resultados de grupos, anteriormente encontrados.

Os grupos formados são concisos apresentando poucos indivíduos que compartilham similaridade genética com outros grupos. O STRUCTURE mostrou que a identidade genética dos indivíduos agrupados num mesmo grupo é alta, para $K=2$. À medida que o K aumenta percebe-se que as populações partilham ainda mais alelos, por isso, na figura B onde é apresentado $K=6$, que representa o número total de populações, existem tantos indivíduos alocados em outros grupos.

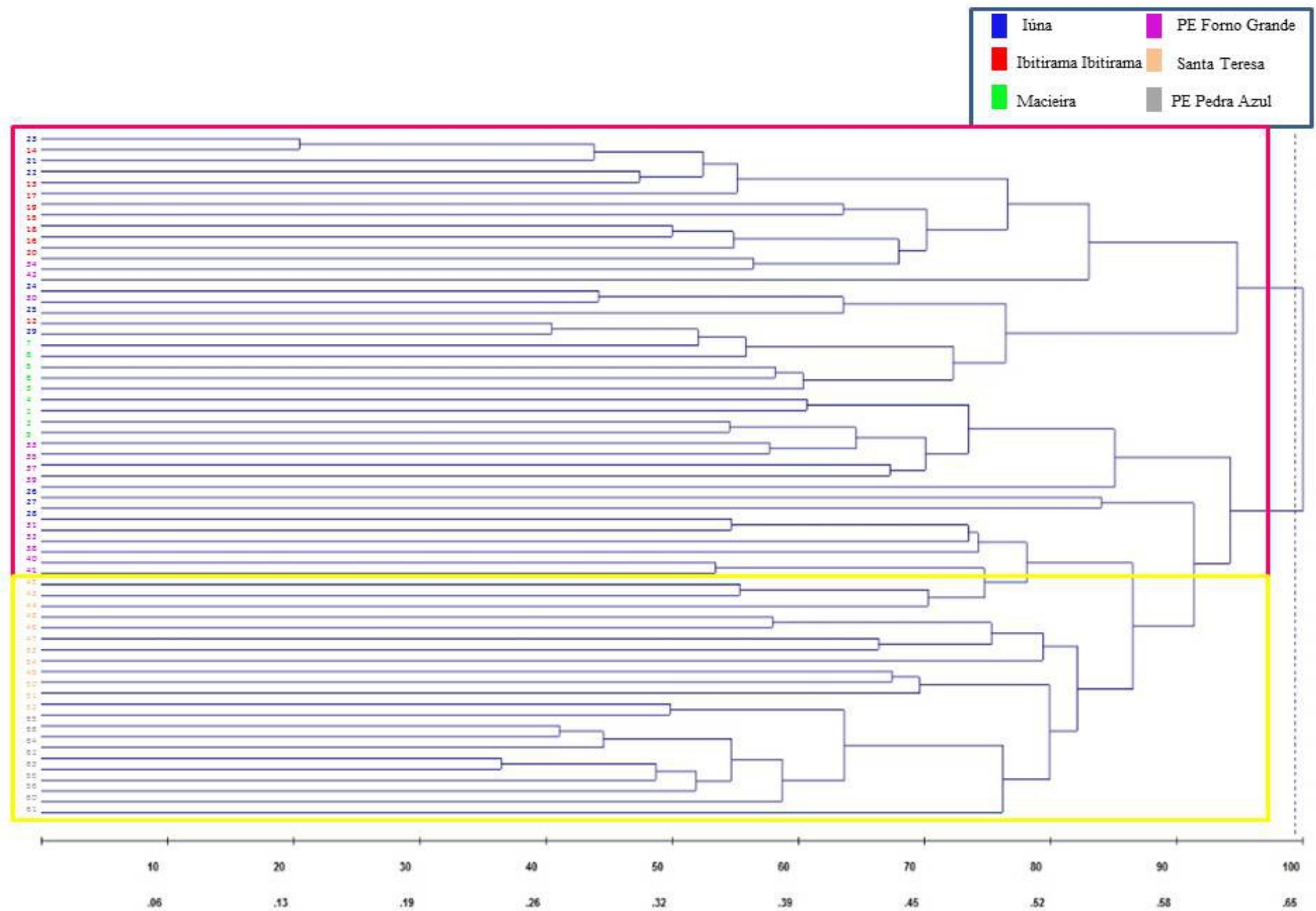


Figura 6- Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido com base em marcadores ISSR, independente das populações, utilizando o método de agrupamento UPGMA para 63 indivíduos de *M. umbellata*.

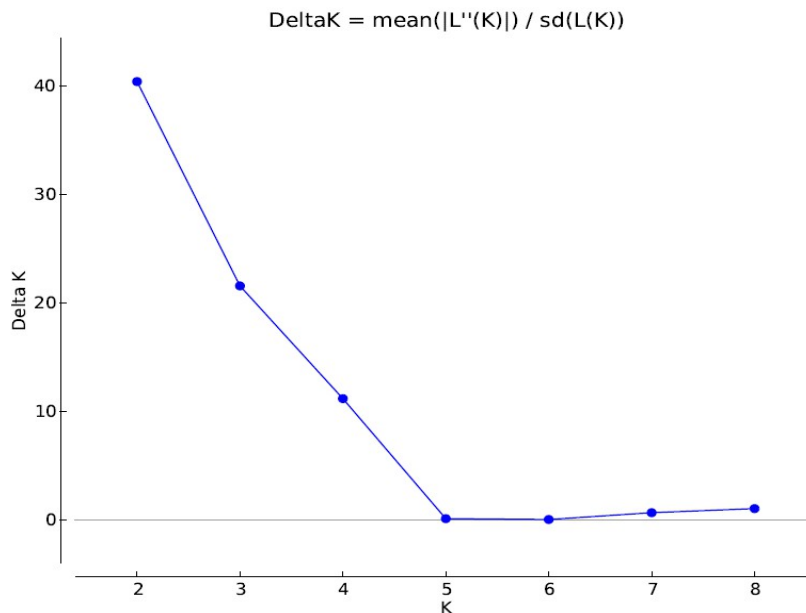
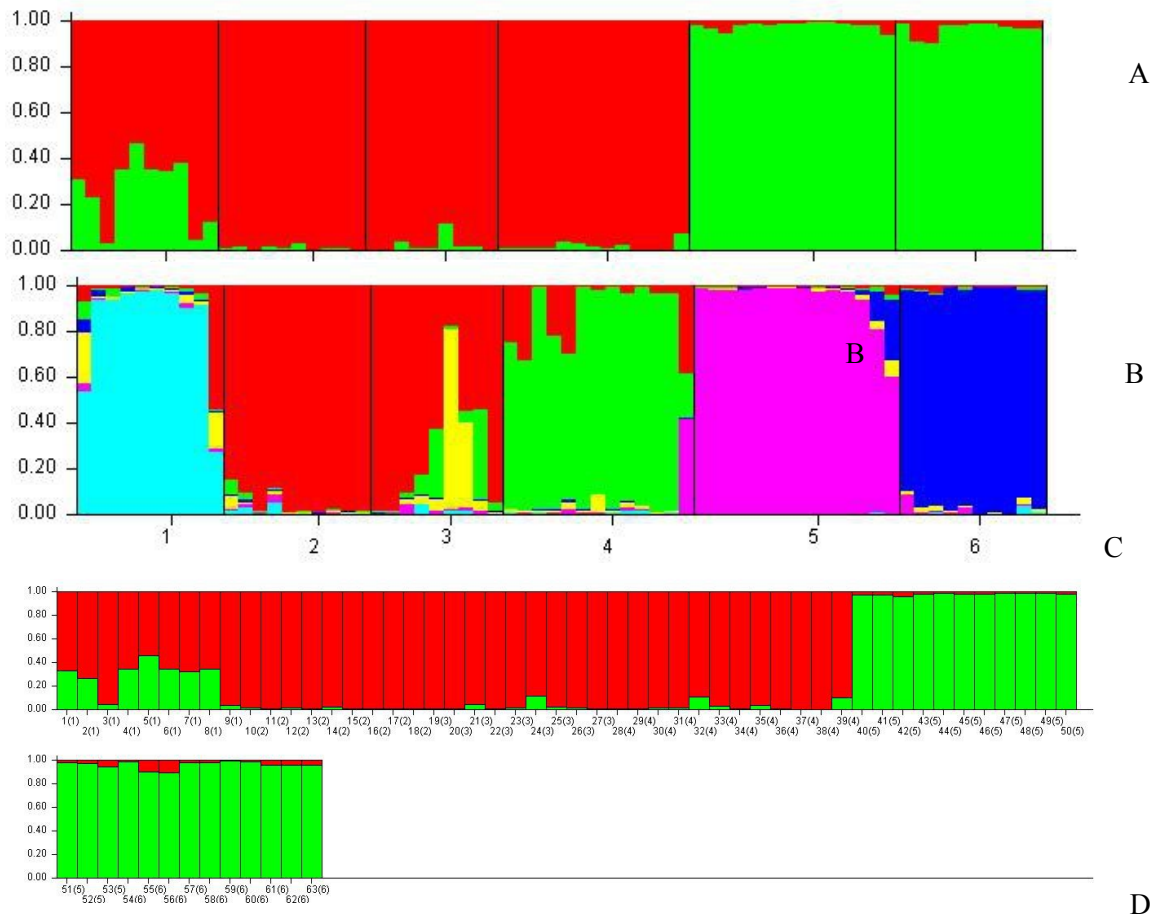


Figura 7- Gráficos obtidos pela análise no STRUCTURE, cada grupo é representado por uma cor, cada indivíduo por uma barra vertical. (A) Gráficos obtidos com K=2 (B) Gráficos obtidos com K=6. (C) Detalhe de cada indivíduo assumindo K=2 (D) Melhor valor obtido para delta K.

6. DISCUSSÃO

6.1 DIVERSIDADE GENÉTICA

Dados genéticos relacionado a diversidade da espécie *M. umbellata* são escassos, sendo necessários trabalhos de avaliação da diversidade genética dado a sua ampla distribuição geográfica, fecundação cruzada, polinização zoocórica e dispersão ornitocórica e caráter pioneiro, podendo ser utilizado como modelo potencial para estudos na Floresta Atlântica (RIBEIRO et al., 2010). Estes atributos fazem com que esta espécie seja classificada como modelo (JUNG-MENDANÇOLLI; BERNACCI, 2005). Desta forma, outras espécies com as mesmas características usualmente apresentam diversidade genética alta, e maior variabilidade intra que interpopulacional a exemplo das espécies da Floresta Atlântica *Passiflora alata* (LOSS et al., 2006); *Eremanthus erythropappus* (RUSCHEL et al., 2009), *Sisyrinchium micranthum* (TACUTIÁ et al., 2012) e *Myrsine coriacea* (PAULA, 2014).

De forma geral foi detectado alto polimorfismo em todas as populações de *M. umbellata* estudadas, sendo a maioria dos ISSR utilizados com 100% de polimorfismos entre todas as populações o que também evidencia a pertinência da ferramenta molecular empregada no estudo.

Nas populações amostradas o polimorfismo variou entre 79,3% (PE Pedra Azul) a 92% (PE Forno Grande). Segundo relatado por Wolfe et al.(1998), que avaliaram *Pestemon centranthifolius*, *P. grinnellii*; e *P. X parishii*, espécies com ampla distribuição geográfica à exemplo de *M. umbellata*, apresentam valores entre 72 e 95% de polimorfismo populacional detectado por marcadores ISSR, em populações naturais.

Entretanto, o índice de Shannon (H') que varia de 0 – 1 (quanto mais próximo de 0 mais baixa é a diversidade genética intrapopulacional adaptado para genética de populações naturais) (BARREIRA-SÁNCHEZ, 2008), variou entre 0,12 (Ibitirama) a 0,18 (Macieira). Estes resultados demonstraram que a espécie *M. umbellata* possui um menor valor de diversidade genética populacional quando comparada à outras espécies com características semelhantes a de espécies modelo, à exemplo

de: *Palicourea coriacea* (Rubiaceae) com $H' = 0,56$ (BARBOSA et al., 2010) e *Eremanthus erythropappus* com valores variando de 0,38 a 0,48 (RUSCHEL et al., 2009), reforçando a necessidade de preservação das áreas de ocorrência natural. Da mesma forma a diversidade genética verificada pelo índice de diversidade Nei (He) os valores variaram entre 0,18- 0,28 para as populações de Ibitirama e Macieira, respectivamente. Esses valores foram baixos quando comparados com outras espécies tropicais como *Trichilia pallida* Swartz (He entre 0,27 a 0,33) (ZIMBACK et al., 2004) e *Aspidosperma polyneuron* (He médio de 0,28) (TOREZAN et al., 2005).

6.2 ESTRUTURA GENÉTICA

As populações amostradas estão estruturadas. O valor do fluxo gênico observado para o conjunto das seis populações foi de 1,24 indicando isolamento genético, o que está associado à distância geográfica entre as populações (WRIGTH, 1931). O valor da estimativa de fluxo gênico determina se a deriva genética, por si só, pode produzir variabilidade genética substancial entre locais; se esse valor for maior que 1.0, o fluxo gênico será alto o suficiente para prevenir diferenciação devida à deriva (MORAES; DERBYSHIRE, 2002). Ademais, o valor obtido, pode corresponder ao fluxo gênico histórico, quando as populações faziam parte de uma única grande população ou constituíam metapopulações, antes do processo de fragmentação da Floresta Atlântica. Assim, os dados devem ser interpretados de maneira cautelosa, pois indicam que as populações das diferentes localidades, apesar da grande distância entre algumas delas, apresentam alelos com frequências que podem ser similares, como resultado de trocas gênicas antigas (HAHN et al., 2012).

A maior parte da variação genética foi intrapopulacional (67.41%), que interpopulacional (32.58%). Para espécies da mesma família resultados semelhantes foram relatados para *Primula apennina* (86% intra; 14% inter) (CREMA et al., 2009); *Primula farinosa* (79,41% da diversidade dentro e 20,59% entre) (REISCHA al., 2005). Em especial, o trabalho realizado por Paula, (2014), em localidades semelhantes, com a espécie *Myrsine coriacea* apresentou 23,38% de

variância entre as populações e 76,61% de variância dentro das populações. Este comportamento também é descrito em espécies tropicais, de características semelhantes as de *M. umbellata*, da Floresta Atlântica, como *Passiflora alata* (LOSS et al., 2006) e *Psychotria ipecacuanha* (ROSSI et al., 2009). Porém, Giustina et al., (2014) e Rivas et al., (2013) encontraram uma maior diferenciação genética interpopulacional do que intrapopulacional ao analisarem populações naturais alógamas, em outros biomas.

A variabilidade genética intra e interpopulacional das populações é reflexo da interação de processos como distribuição geográfica, fragmentação e isolamento das populações, sistema reprodutivo, mutação, deriva, fluxo gênico entre outros (NYBOM; BARTISH, 2000). Espécies alógamas, em geral, apresentaram alta variação genética intrapopulacional em detrimento à interpopulacional, sendo a divergência dentro de populações inversamente proporcional à quantidade de fluxo gênico. A estruturação da diversidade genética em indivíduos dentro de populações naturais de plantas pode influenciar de maneira significativa os processos evolucionários e ecológicos, sendo que esta variação genética poderá ter consequências diretas sobre os processos de diferenciação que levam à especiação, pois a estruturação em microhabitats pode promover por meio de seleção e deriva a formação local de novos genótipos (PERECIN et al., 2004).

Outro fator que se credita uma maior diversidade genética intrapopulacional pode estar relacionado ao efeito Poleiro, apresentado para *M. umbellata*. Por meio das fezes e material biológico regurgitado pelas aves dispersoras da espécie, ocorre a deposição de sementes nas proximidades de poleiros, formando núcleos de diversidade, dentro das populações e consequentemente aumentando a diversidade genética (CARRIJO, T. T., comunicação pessoal)¹.

Além disto, a menor diversidade interpopulacional detectada (32,58%), pode estar relacionada ao fato da espécie ter aspecto colonizador, uma vez que (GAMSKIN et al., 2012), em estudos com *Lepidium latifolium* relatam que a baixa variação entre populações de plantas com aspecto colonizador podem ser devido a possíveis efeitos fundadores ou gargalos genéticos antes ou após eventos de colonização e introdução.

¹ Informação fornecida por CARRIJO na Universidade Federal do Espírito Santo Centro de Ciências Agrárias em 2015.

De modo geral as populações amostradas apresentaram níveis de moderada a elevada estrutura genética (0,11- 0,4), com média de Φ_{ST} de 0,32. As populações que apresentaram os menores valores foram Ibitirama e Lúna (Φ_{ST} de 0,11), as mais próximas, com altitudes variando entre 1577 e 1074 respectivamente. Estes valores indicam estruturação moderada. A maior estruturação genética entre as demais populações pode estar ocorrendo em decorrência de fatores como: fragmentação florestal, heterogeneidade ambiental, densidade populacional, morfologia floral, sistema reprodutivo, mecanismos de polinização e dispersão de sementes (LOVELESS; HAMRICK, 1984; HEYWOOD, 1991; HAMRICK et al., 1993; MANEL et al., 2003; VEKEMANS; HARDY, 2004).

As populações do Caparaó (Macieira, Ibitirama, Lúna) e PE Forno Grande (a de maior altitude), ficaram em um grupo. O agrupamento de PE Forno Grande com essas populações não pode ser explicado geograficamente, visto que se encontram distantes. Acredita-se que essa população faça parte de um contínuo vegetacional que culmina na Região do Caparaó (CARRIJO, T.T., comunicação pessoal)¹, passando pelo município de Muniz Freire, que não foi amostrado, podendo ter ocorrido fluxo gênico entre essas regiões. A mesma explicação é dada para o agrupamento entre as populações de Santa Teresa (623) e PE Pedra Azul (1250), que foram alocadas juntas embora não sejam geograficamente próximas. Uma hipótese que se levanta nesta situação é que ocorra entre essas populações encontram-se outras populações (principalmente em Santa Maria do Jetibá) e que tenha ocorrido houve fluxo gênico entre elas. A formação de grupos pela análise do STRUCTURE corroborou os resultados de agrupamento, sendo possível identificar dois grupos de populações.

De acordo com os dados, as populações de PE Pedra Azul e Santa Teresa são as mais estruturadas, e menores níveis de fluxo gênico ocorrem entre elas enquanto as populações de Macieira, Lúna, Ibitirama e PE Forno Grande apesar de apresentarem de moderada a alta estrutura genética, estão sujeitas ao fluxo gênico.

7. CONCLUSÕES

O marcador ISSR indicou altos níveis de polimorfismo interpopulacional e intrapopulacional em *Myrsine umbellata*.

A maior variabilidade genética foi encontrada dentro das populações em comparação com a diversidade genética entre as populações. Os mecanismos de polinização e dispersão aparentam serem os principais componentes das histórias-de-vida que regulam a diversidade genética da espécie.

As populações estão de moderada a altamente estruturadas e o fluxo gênico apresentado foi baixo. Isso possivelmente está relacionado a distância geográfica entre elas, indicativo de isolamento genético.

Os dados encontrados indicam que estratégias de conservação para populações de *M. umbellata* devem priorizar a amostragem intrapopulacional, dado que estas são um reservatório importante de recursos de germoplasma conservados *in situ*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C. M. A. et al. Genetic Diversity in *Aechmea fulgens* (Bromeliaceae: Bromelioideae) Revealed by Molecular Markers. **Genetic Diversity in Plants**, v. 51, pag. 953-978, 2012.
- ANDRADE, I. M. et al., A preliminary study of genetic variation in populations of *Monstera adansonii* var. *klotzschiana* (Araceae) from north-east Brazil, estimated with AFLP molecular markers . **Annals of Botany**, v. 100, p.1143–1154, 2007.
- AVISE, J.C. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. **Conservation Genetics**, v.11, p. 665-669, 2010.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do sul: guia de identificação e interesse ecológico**. 1ª ed. Santa Maria: Editora Palloti, 2002.
- BARBOSA, T. C. S. et al. Genetic characterization of natural populations of the medicinal plant *Palicourea coriacea* (Rubiaceae) with molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 2, p. 695-704, 2010.
- BARRERA SÁNCHEZ, C.F. **Diversidade entre e dentro de populações simuladas sob deriva genética**. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)- Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- BORBA, R. D. A. et al. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma Westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 565-569, 2005.
- BOUZAT, J. L. The population genetic structure of the Greater Rhea (*Rhea americana*) in an agricultural landscape. **Biological Conservation**, v. 99, p. 277-284, 2001.
- BRANDÃ, M. M.; **Diversidade genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor-fragmento semidecíduais no Sul de Minas Gerais**. 2008.81 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Lavras –UFLA, Lavras, 2008.
- BUSO, S. G. C. et al.; Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. Circular Técnica. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília DF, p. 1516- 4349, 2003.
- BUZATTI, R. S. de O.; RIBEIRO, R. A., LEMOS, J.P de, LOVATO, M. B. Fine-scale spatial genetic structure of *Dalbergia nigra* (Fabaceae), a threatened and endemic tree of the Brazilian Atlantic Forest. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 838-846, 2012.

CABALLERO, A.; RODRÍGUEZ-RAMILO, S.T.; ÁVILA, V. Management of genetic diversity on subdivided populations in conservation programmes. **Conservation Genetics**, v.11, p. 409-419, 2010.

CARVALHO, P.E.R.C. Espécies Arbóreas Brasileiras. Embrapa Informação tecnológica, Brasília- DF, p. 156- 234, 2006.

CAVALLARI, M. M. **Estrutura genética de populações de Encholirium (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação**. 2004. 92f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

CREMA, S. et al. High genetic diversity detected in the endemic *Primula apennina* Widmer (Primulaceae) using ISSR fingerprinting. **Plant System Evolution**, vol. 280, p. 29-36, 2009.

CRUZ, C. D.; GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p. 13-15. 1990.

EARLI, D. A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing ,STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, vol. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

ESTOPA, R. A. et al. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Scientia Forestalis**, n. 70, p. 97-106, abr. 2006.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology Notes**, v.14, p. 2611–2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. **Genetics**, v.131, p. 479–491, 1992.

FAJARDO, C.G. et al. Selection of primers for ISSR study of conservation genetics *Cattleya granulosa* Lindl. an endemic and endangered orchid of Northeastern Brazil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2011, Águas de Lindóia. **Anais eletrônicos**. Disponível em: www.sbg.org.br/anais.htm. Acesso em 10 jul. 2015.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, v.7, p.574–578, 2007.

FORTI, G. Low genetic diversity and intrapopulation spatial genetic structure of the Atlantic Forest tree, *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae). **Annals Resource**, vol. 57, n. 2, p. 165-174, 2014.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 2008.

GAOTTO, F. A.; GRATTAPAGLIA, D. E.; VENKOVSKY, R. Genetic structure, mating system and long distance gene flow in Heart of Palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of Heredity**, v. 94, n. 5, p. 399-406, 2003.

GALLETTI, P. M. et al. Genética da conservação brasileira. In: FRANKHAM, R. et al. **Fundamentos de Genética da Conservação**. 1ª ed. Ribeirão Preto: Editora SBG, 2008. p. 244-274.

GAMSKIN, J.F. et al. Minimal genetic diversity in the facultatively outcrossing perennial pepperweed (*Lepidium latifolium*) invasion. **Biological Invasions**, v.14, p.1797–1807, 2012.

GANZHORN, M. et al. Effects of fragmentation on density and population genetics of a threatened tree species in a biodiversity hotspot. **Endang Species Resources**, vol. 26, p. 189–199, 2015.

GEORGE, S.; SHARMA, J.; YADON, Y.L. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. **American Journal of Botany**, v. 96, p. 2022–2030, 2009.

GIUSTINA, L. D. et al. Population structure and genetic diversity in natural populations of *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng (Malvaceae). **Genetics and Molecular Research**, v.13, n. 2, p. 3510-3519. 2014.

GONÇALVES, L. O. et al. Caracterização genética de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) em áreas de baixa ocorrência. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 2, p. 290-298, 2014.

GOULART, M. F.; LEMOS-FILHO, J. P. e LOVATO, M. B. Phenological variation within and among populations of *Plathymenia reticulata* in Brazilian Cerrado, the Atlantic Forest and transitional sites. **Annals of Botany**, v. 96, p. 445-455. 2005.

GRATIVOL, C. et al. High efficiency and of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular Biology Reports**, v.38, p.4245-4256, 2011.

HAHN, T. et al. Patterns of genetic variation across altitude in three plant species of semi-dry grasslands. **PLoS ONE**, v. 15, p.212-234, 2012.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. **Plant population genetics, breeding and genetic resources**, v. 34, p. 43-63, 1989.

HAMRICK; J. L.; MURASWSKI, D. A.; NASON, J. D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Vegetation**, v.107/108, p.281-297, 1993.

HARTL, D.; ANDREW, C. **Principles of Population Genetics**. 4. ed. Sunderland, 2007.

HEDRICK, P. **Genetics of Populations, A recent and thorough summary of the principles of population genetics**. 3. ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 2005.

HEYWOOD. J. S. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.22, p.335-355, 1991.

HOU, Y.; LOU, A. Population genetic diversity and structure of a naturally isolated plant species, *Rhodiola dumulosa* (crassulaceae). **Plos One**, v.6, p. 183-195, 2011.

JIA, X.D. et al. Genetic diversity and identification of Chinese- grown pecan using ISSR e SSR markers. **Molecules**, v.16, p.10078-10092, 2011.

JUCHUM, F.S. et al. Evaluation of genetic diversity in a natural rosewood population (*Dalbergia nigra* Vell. Allemão ex Benth.) using RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, vol. 6, n. 3, p. 543-553, 2007.

JUNG-MENDAÇOLLI, S. L.; BERNACCI, L. C. Flora Fanerogâmica do estado de São Paulo. 4. Ed. São Paulo: Editora Rima, 2006.

KAGEYAMA, P. Y. et al. Genetic diversity in tropical tree species from different successional stages determined with genetic. **Scientia Forestalis**, v. 64, p. 93–107, 2003.

KOZEN, E.R. Towards conservation strategies for forest tree endangered species: the meaning of population genetic statistics. **Advances in Forestry Science**, v.1, n.1, p.45-51, 2014.

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, v. 6, p. 381-398, 1972.

LIU, B.; WENDEL, J. F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 205-208, 2001.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2002.

LOSS, A.C.C. et al. Diversidade genética de populações de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) no estado do Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line**, vol. 4, n. 2, p. 55-61, 2006.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L.; FOSTER, R. B. Population structure and mating system in *Tachigali versicolor*, a monocarpic neotropical tree. **Heredity**, essex, v. 81, p. 134-143, 1998.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.15, p.65-95, 1984.

MANEL, S. et al. Landscape genetics: combining ecology and population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, v.18, n.4, p.189–197, 2003.

MARTINS, K. et al. Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae – Caesalpinioideae) em fragmentos florestais no Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.31, n.1, p.61-69, 2008.

MAUSETH, J.H. Plant Anatomy. Menlo Park: **The Benjamin/cummings Publishing Company**, vol. 15, p. 473-497, 1988.

MELO, A. T. et al. High genetic diversity and strong spatial genetic structure in *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae): implications to Brazilian Atlantic Forest tree conservation. **Natureza e Conservação**, vol. 1, n. 2, p. 129–133, 2014.

MORAES, P. L.R.; MONTEIRO, R.; VENCovsky, R.. Estrutura genética intrapopulacional em *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae). **Revista brasileira de botânica**, vol. 27 n. 3, p. 475-487, 2004.

MORAES, P.L.R.; DERBYSHIRE, M.T.V.C. Estrutura genética de populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae) através de marcadores isoenzimáticos. **Biota Neotropica**, vol. 2, n. 2, p. 237-248, 2002.

MORAES, R.M.; BONIFÁCIO-ANACLETO, F.; ALZATE-MARIN, A.L. Fragmentation effects and genetic diversity of the key semideciduous forest species *Metrodorea nigra* in Southwestern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, vol. 14, n. 2, p. 3509-3524, 2015.

MOURA, M. C. O. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish por isoenzimas e RAPD**. 2005. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2005.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.

NETO, O.C. et al. Genetic and Ecological Outcomes of *Inga vera* Subsp. *affinis* (Leguminosae) Tree Plantations in a Fragmented Tropical Landscape. **Plos One**, vol. 4, n.6, p. 1-8, 2014.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1143-1155, 2004.

NYBOM, H.; BARTISH, I. V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 3, n. 2, p. 93-114, 2000.

OHSAWA, T.; YUJI, I.. Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. **Global Ecology and Biogeography**, vol.17, p. 152–163, 2008.

OLIVEIRA, F. F. G.; MATTOS, J. T. Análise ambiental de remanescentes do bioma Mata Atlântica no litoral sul do Rio Grande do Norte – NE do Brasil. *Espaço e Tempo*, v. 18, n. 1, p. 165-183, 2014.

OLIVEIRA, L. O. et al. Clonal diversity and conservation genetics of the medicinal plant *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae). **Genetics and Molecular Biology**, vol. 33, n. 1, p. 86-93, 2010.

OLIVEIRA, R.C.G.; ISEPPON, A.M. **Diversidade genética de populações de *Cyperus Ligularis* L. (Cyperaceae) através de DAF e ISSR em fragmentos urbanos de Floresta Atlântica**. CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 27, 2009. Pernambuco. Anais eletrônicos. Disponível em: < [http://www.contabeis.ufpe.br/propesq/images/conic/2009/anais%20\(E\)/conic/pibic/20/092021417SCPO.pdf](http://www.contabeis.ufpe.br/propesq/images/conic/2009/anais%20(E)/conic/pibic/20/092021417SCPO.pdf) >. Acesso em 10 jul. 2015.

PAULA, L. G. de. **Diversidade Genética de *Myrsine coriacea* em remanescentes de Mata Atlântica**. 2014. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas)- Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2014.

PEAKALL, R. et al. Comparative genetic study confirms exceptionally low genetic variation in the ancient and endangered relictual conifer, *Wollemia nobilis* (Araucariaceae). **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2331-2343, 2003.

PERECIN, M.B. **Diversidade genética em populações naturais de espécies de espinheira-santa, *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex. Reiss. (Celastraceae)**. Piracicaba, 2004. 134p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, 2004.

PIERCE, B. A. **Genética Essencial: Conceitos e Conexões**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara –Koogan, 2011.

PINHEIRO, L.R. et al. Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 12, p.1815-1828, 2012.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p.945-959, 2000.

RAKOCZY-TROJANOWSKA, M.; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v.9, p.221-238, 2004.

REISCHA, C.; ANJA, A.; MARKUS, R. Molecular variation within and between ten populations of *Primula farinosa* (Primulaceae) along an altitudinal gradient in the northern Alps. **Basic and Applied Ecology**, vol.6, p. 35-45, 2005.

RENAU-MORATA, B. et al. Genetic diversity and structure of natural and managed populations of *Cedrus atlantica* (Pinaceae) assessed using random amplified polymorphic DNA. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 5, p. 875-884, 2005.

RIBEIRO, M.V. et al. Diversidade genética entre acessos de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reis.) coletados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira Plantas Medicinai*s, v.12, n.4, p.443-451, 2010.

RIVAS, L. H. et al. Genetic diversity in natural populations of *Theobroma subincanum* Mart. in the Brazilian Amazon. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4998-5006, 2013.

RODRIGUES, J.F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg. (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR.** 2011, 84p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

ROSSI, A. A. B. et al. Genetic diversity and geographic differentiation of disjunct Atlantic and Amazonian populations of *Psychotria ipecacuanha* (Rubiaceae). **Genética (The Hague)**. v. 136, n. 1, p. 57-67, 2009.

RUSCHEL, A. R., BERNARD, F. NODARI, R. O., MOERSCHBACHER, B. M. Estado genético de *Sorocea bonplandii* na fragmentada floresta no sul do Brasil. **Scientia Florestalis**, v. 37, n. 82, p. 151-161, jun. 2009

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SALEH, B. Efficiency of RAPD and ISSR markers in assessing genetic variation in *Anthrocnemum macrostachyum* (Chenopodiaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, n.5, p.859-866, 2011.

SCHAAL, B. A. et al. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. **Molecular Ecology**, vol.7,p. 465-474, 1998.

SEBBENN, A. M.; ETTORI, L. C. Conservação genética *ex situ* de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruon urundeuva* e *Peltophorum dubium* em teste de progênes misto. **Revista do Instituto Florestal**, v. 13, n. 22, p. 201- 211, 2001.

SHAH, A. et al. Genetic diversity within and among populations of the endangered species *Taxus fuana* (Taxaceae) from Pakistan and implications for its conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol. 36, p. 183-193, 2008.

SHARMA, S.K.S.; KUMARIA, P.; TANDON S.R. Analysis of genetic variation and identification of species-diagnostic ISSR markers in five species of *Cymbidium* (Orchidaceae). **Plant Biochemical Biotechnology**, v.22, p 250-255, 2012.

SILVA, C. A. et al. Reproductive success and genetic diversity of *Psychotria hastisepala* (Rubiaceae), in fragmented Atlantic forest, Southeastern Brazil. **Revista de Biologia Tropical (International Journal of tropical Biology and Conservation)**, vol. 62, n. 1, p. 309-319, 2014.

SILVA, M. A. et al. Phytochemical and genetic variability of *Casearia sylvestris* Sw. from São Paulo State Atlantic Forest and Cerrado populations. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.8, n.esp., p.159-166, 2006.

SLOTTA, T. A. B.; PORTER, D. M. Genetic variation within and between *Iliamna corei* and *I. remota* (Malvaceae): implications for species delimitation. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 151, p. 345-354, 2006.

SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S.R. **Biologia Molecular e Evolução**. 2ª ed. Ribeirão Preto: Holos Editora. p. 172-192, 2001.

SOS Mata Atlântica, A Mata Atlântica. Disponível em: <http://www.sosma.org.br/>. Acesso: 15 de julho de 2015.

SOUZA, L. B. et al. AFLP marker analysis revealing genetic structure of the tree *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Leguminosae-Mimosoideae) in the southern Brazilian Tropical Rainforest. **Genetics and Molecular Biology**, vol. 36, n.4, p. 533-539, 2013.

TABARELLI, M. A. V. et al. Prospects for biodiversity conservation in the Atlantic Forest: lessons from aging human-modified landscapes. **Biological Conservation**, vol. 143, p. 2328–2340, 2010

TACUTIÁ, L. OL. et al. Population genetic structure of *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae) in Itapuã State Park, Southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, vol.35, n.1, p. 99-105, 2012.

TALLES, M. P. C. et al. Divergência entre subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica*) em resposta a padrões edáficos e distribuição espacial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 11, p. 1387-1394, 2001.

TOREZAN, J. M. D. et al., Genetic variability of pré and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n.2, p.171-180, 2005.

VASCONCELOS, A.L.B. et al. **Intrapopulation genetic variability using RAPD and ISSR markers in *Melanoxylon braúna***. CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 58. 2008, Foz do Iguaçu. **Anais eletrônicos**. Disponível em: www.sbg.org.br/anais.htm. Acesso em 10 jul. 2015.

VASCONCELOS, G. M. P. **Diversidade genética de *Myrciaria floribunda* (West ex Wildenow) Berg. (Cambuí) em paisagem fragmentada da serra da Mantiqueira, MG**. 2002. 72 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2002.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, v.13, p.921-935, 2004.

VIEIRA, F. de A. **Diversidade e estrutura genética de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler em remanescentes e corredores de vegetação na região do Alto Rio Grande-MG**. 2005. 100 p. Dissertação (Mestrado Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2005.

WOLFE, A. D.; XIANG, Q. Y.; KEPHART, S. R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1107- 1125, 1998

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, p. 97-159, 1931.

XIAO, M. et al. ISSR analysis of the genetic diversity of the endangered species *Sinopodophyllum hexandrum* ying from Western Sichuan Province, China. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 48, n. 10, p. 1140-1146, 2006.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. POPGENE: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis: version 1.3: manual. Edmonton: University of Alberta, 1999.

ZHANG L. et al. Genetic diversity and geographic differentiation in *Tacca chantrieri* (Taccaceae): An autonomous selfing plant with showy floral display. **Annals of Botany**, v. 98, p. 449–457, 2006.

ZHANG, L. et al. Genetic diversity and geographic differentiation in *Tacca chantrieri* (Taccaceae): An autonomous selfing plant with showy floral display. **Annals of Botany**, v. 98, p. 449–457, 2006.

ZIETJIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176-183, 1994.

ZIMBACK, L. E. Estrutura genética de populações de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) por marcadores RAPD. **Scientia Florestalis**, n. 65, p. 114-119, 2004